(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월12일
(11) 등록번호 10-2780121
(24) 등록일자 2025년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 35/28* (2015.01)
A61K 35/76 (2015.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) *A61P 21/04* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
C12N 7/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7008314
(22) 출원일자(국제) 2018년08월22일
심사청구일자 2021년08월20일
(85) 번역문제출일자 2020년03월20일
(65) 공개번호 10-2020-0054210
(43) 공개일자 2020년05월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/047586
(87) 국제공개번호 WO 2019/040655
국제공개일자 2019년02월28일
(30) 우선권주장
62/548,891 2017년08월22일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Mol. Ther., Vol.16, No.1, pp.194-202(2007.11.06.)*
Science, Vol.341, No.6148, pp.1233151(2013.07.11.)*
Nature, Vol.463, No.7282, pp.808-812(2010.01.13.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
더 리전트 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
미국 94607-5200 캘리포니아주 오클랜드 플랭크린 스트리트 1111 12층
더 보드 어브 트러스티스 어브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티
미국 94305-2038 캘리포니아주 스탠포드 피오 박스 20386 메인 퀴드 빌딩 170 3층 오피스 오브 더 제너럴 카운셀
(72) 발명자
콘 도날드 비
미국 91356 캘리포니아주 타자나 주빌로 드라이브 4256
론카롤로 마리아 그라치아
미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 샤론 파크 드라이브 1274
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

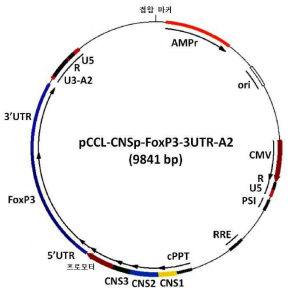
전체 청구항 수 : 총 14 항 심사관 : 전명숙

(54) 발명의 명칭 **면역 결핍 및 자가면역 질환을 치료하기 위한 조혈모세포에서 FOXP3 을 발현하는 렌티바이러스 벡터**

(57) 요 약

다양한 실시형태에서, FoxP3의 생리적 유전자 발현을 조절하는 내인성 유전자 요소를 사용하여 FoxP3을 발현하는 렌티바이러스 벡터뿐만 아니라, 이와 같은 벡터의 용도가 본 명세서에서 제공된다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61K 35/76 (2013.01)
A61K 38/1709 (2020.05)
A61P 19/02 (2018.01)
A61P 21/04 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C12N 5/0663 (2013.01)
C12N 5/0665 (2013.01)
C12N 7/00 (2013.01)
C12N 2501/60 (2013.01)
(72) 발명자
홀리스 로저 피
미국 90019 캘리포니아주 로스앤젤레스 웨스트 17번 스트리트 4634
메지우크 케이틀린 이
미국 90404 캘리포니아주 산타 모니카 스탠포드 스트리트 1527 아파트먼트 5
베체타 로사
미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 샌드 힐 서클 134

명 세 서

청구범위

청구항 1

재조합 렌티바이러스 벡터(LV)로서,

FoxP3-CNS1, FoxP3-CNS2, 및 FoxP3-CNS3 서열 및 내인성 FoxP3 프로모터에 작동 가능하게 연결된 인간 FoxP3 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 작제물을 포함하는 발현 카세트를 포함하되;

상기 LV는 TAT-독립적 자가-불활성화(SIN) 렌티바이러스 벡터인, 재조합 렌티바이러스 벡터(LV).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인간 FoxP3 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 FoxP3 cDNA를 포함하는, 재조합 렌티바이러스 벡터(LV).

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 인간 FoxP3을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 코돈 최적화된, 재조합 렌티바이러스 벡터(LV).

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 벡터는 FoxP3 3'UTR을 포함하고/하거나;

상기 벡터는 Ψ 영역 벡터 게놈 패키징 신호를 포함하고/하거나;

상기 벡터는 CMV 인핸서/프로모터를 포함하는 5' LTR을 포함하고/하거나;

상기 벡터는 Rev 반응 요소(Rev Responsive Element: RRE)를 포함하고/하거나;

상기 벡터는 절연체 요소를 포함하고/하거나;

상기 벡터는 A2 절연체를 포함하고/하거나;

상기 벡터는 U3 영역 내에 A2 절연체를 포함하는,

재조합 렌티바이러스 벡터(LV).

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 벡터는 PCCL 백본을 포함하는, 재조합 렌티바이러스 벡터(LV).

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 벡터를 이용하여 형질감염된 세포는 림프구에서 FoxP3의 발현을 회복하는, 재조합 렌티바이러스 벡터(LV).

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 벡터는 서열번호 1의 핵산을 포함하는, 재조합 렌티바이러스 벡터(LV).

청구항 8

제1항 또는 제7항의 발현 카세트를 포함하는 벡터를 이용하여 형질감염된 패키징 세포.

청구항 9

제1항 또는 제7항의 발현 카세트를 포함하는 벡터에 의해 암호화된 렌티바이러스 입자.

청구항 10

FoxP3-CNS1, FoxP3-CNS2, 및 FoxP3-CNS3 서열 및 내인성 FoxP3 프로모터에 작동 가능하게 연결된 단백질을 발현하는 핵산을 포함하는 감염성 렌티바이러스 입자.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 바이러스 입자는 제1항의 발현 카세트를 포함하는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 생성된 것인, 감염성 렌티바이러스 입자.

청구항 12

제1항 또는 제7항의 발현 카세트를 포함하는 재조합 렌티바이러스 벡터(LV)로서, FoxP3 발현이 결핍된 포유동물에서 조절 T 세포(Treg) 기능을 회복시키는 치료에서 사용하기 위한, 재조합 렌티바이러스 벡터(LV).

청구항 13

제1항 또는 제7항의 발현 카세트를 포함하는 재조합 렌티바이러스 벡터(LV)로서, 자가면역 장애의 치료에서 사용하기 위한, 재조합 렌티바이러스 벡터(LV).

청구항 14

제13항에 있어서, 중증 근무력증, 다발성 경화증, 면역 조절이상, 다발성 내분비병증 장병증 X-연관(IPEX), 및 자가면역성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 자가면역 장애의 치료에서 사용하기 위한, 재조합 렌티바이러스 벡터(LV).

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호-참조**

[0002] 본 출원은 2017년 8월 22일자로 출원한 USSN 62/548,891의 이익, 및 이에 대한 우선권을 주장하며, 이는 모든 목적을 위해 본 명세서에 전문이 참조에 의해 원용된다.

[0003] **정부 지원 진술**

[0004] [해당 사항 없음]

배 경 기 술

[0005] (유전적 돌연변이를 통하여) FoxP3 유전자 기능이 선천적으로 없는 환자는 동종이계 조혈모세포 이식(hematopoietic stem cell transplantation; HSCT)으로 치료하여 필요한 FoxP3 유전자 기능을 갖는 면역 이펙터(effector) 세포의 정상적인 집단을 생성하는 정상적인 줄기 세포의 공급원을 제공할 수 있다. 그러나, 동종이계 HSCT는 잘 일치하는 공여자의 필요성 및 공여자와 수용자 사이의 면역학적 차이로 인한 이식 거부 또는 이식편대숙주병에 대한 위험에 의해 제한된다.

[0006] 유전자 보정 HSC의 자가 이식은 이러한 면역 합병증을 회피할 것이며 훨씬 더 효과적인 HSCT가 수행될 수 있게 한다. 환자 유래의 자가 T 세포는 구성적 프로모터를 이용하여 이러한 인자(FoxP3)를 발현하는 벡터에 의해 변형될 수 있지만, 이러한 T 세포는 생체 내에서 한정된 수명을 가지고 시간에 따라 그 효과가 약해질 수 있다.

[0007] 많은 유형의 면역 억제 약물(코르티코스테로이드, 칼시뉴린 억제제, 대사길항형(anti-metabolite) 뉴클레오사이드 등)은 유전적 또는 후천적 자가면역/자가염증 질환의 합병증 중 일부를 억제할 수 있지만, 단지 부분적 또는 최소로 효과적일 수 있으며, 상당한 독성이 있을 수 있다.

발명의 내용

[0008] 본 명세서에서 고려되는 다양한 실시형태는 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있지만, 이에 제한될 필요는 없다:

[0009] 실시형태 1: 내인성 FoxP3 프로모터에 작동 가능하게 연결된 인간 FoxP3 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 작제물을 포함하는 발현 카세트

[0010] 를 포함하는 재조합 렌티바이러스 벡터(lentiviral vector; LV)로서,

[0011] 상기 LV는 TAT-독립적 자가-불활성화(self-inactivating; SIN) 렌티바이러스 벡터인, 벡터.

[0012] 실시형태 2: 실시형태 1에 있어서, 상기 인간 FoxP3 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 FoxP3 cDNA를 포함하는, 벡터.

[0013] 실시형태 3: 실시형태 1 및 2 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 FoxP3을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 코돈 최적화된, 벡터.

[0014] 실시형태 4: 실시형태 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 FoxP3 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 하나 이상의 FoxP3 인핸서 요소에 작동 가능하게 연결된, 벡터.

[0015] 실시형태 5: 실시형태 4에 있어서, 상기 인핸서 요소는 Foxp3 보존된 비-코딩 서열 1(FoxP3-CNS1), Foxp3 보존된 비-코딩 서열 2(FoxP3-CNS2), 및 Foxp3 보존된 비-코딩 서열 3(FoxP3-CNS3)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 벡터.

[0016] 실시형태 6: 실시형태 5에 있어서, 상기 발현 카세트는 FoxP3-CNS1, FoxP3-CNS2, 및 FoxP3-CNS3을 포함하는,

벡터.

[0017] 실시형태 7: 실시형태 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 FoxP3 3'UTR을 포함하는, 벡터.

[0018] 실시형태 8: 실시형태 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 Ψ 영역 벡터 게놈 패키징 신호를 포함하는, 벡터.

[0019] 실시형태 9: 실시형태 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 5' LTR은 CMV 인핸서/프로모터를 포함하는, 벡터.

[0020] 실시형태 10: 실시형태 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 Rev 반응 요소(Rev Responsive Element; RRE)를 포함하는, 벡터.

[0021] 실시형태 11: 실시형태 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 중심 폴리퓨린관을 포함하는, 벡터.

[0022] 실시형태 12: 실시형태 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 절연체 요소를 포함하는, 벡터.

[0023] 실시형태 13: 실시형태 12에 있어서, 상기 벡터는 A2 절연체를 포함하는, 벡터.

[0024] 실시형태 14: 실시형태 13에 있어서, 상기 벡터는 U3 영역 내에 A2 절연체를 포함하는, 벡터.

[0025] 실시형태 15: 실시형태 1 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 재조합을 통하여 야생형 렌티바이러스를 재구성할 수 없는, 벡터.

[0026] 실시형태 16: 실시형태 1 내지 15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 PCCL 백본을 포함하는, 벡터.

[0027] 실시형태 17: 실시형태 1 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터를 이용하여 형질감염된 세포는 적절한 성숙한 림프구에서 FoxP3의 정상적인 생리적 발현을 반복하는, 벡터.

[0028] 실시형태 18: 실시형태 1에 있어서, 상기 벡터는 서열번호 1의 핵산을 포함하는, 벡터.

[0029] 실시형태 19: 실시형태 1 내지 18 중 어느 하나에 따른 벡터를 이용하여 형질감염된 패키징 세포.

[0030] 실시형태 20: 실시형태 1 내지 18 중 어느 하나에 따른 벡터에 의해 암호화된 렌티바이러스 입자.

[0031] 실시형태 21: 실시형태 1 내지 18 중 어느 하나에 따른 렌티바이러스 벡터에 의해 암호화된 렌티바이러스 입자를 이용하여 감염된 숙주 세포.

[0032] 실시형태 22: 실시형태 21에 있어서, 상기 세포는 줄기 세포인, 숙주 세포.

[0033] 실시형태 23: 실시형태 21에 있어서, 상기 세포는 골수로부터 유래된 줄기 세포인, 숙주 세포.

[0034] 실시형태 24: 실시형태 21에 있어서, 상기 세포는 제대혈로부터 유래된 줄기 세포인, 숙주 세포.

[0035] 실시형태 25: 실시형태 21에 있어서, 상기 세포는 말초 혈액 줄기 세포인, 숙주 세포.

[0036] 실시형태 26: 실시형태 21에 있어서, 상기 세포는 인간 조혈 전구 세포인, 숙주 세포.

[0037] 실시형태 27: 실시형태 21에 있어서, 상기 인간 조혈 전구 세포는 $CD34^{+}$ 세포인, 숙주 세포.

[0038] 실시형태 28: 실시형태 27에 있어서, 상기 인간 조혈 전구 세포는 $CD34^{+}CD38^{-}$ 세포인, 전구 세포.

[0039] 실시형태 29: 인간 FoxP3 단백질을 발현하는 핵산을 포함하는 감염성 렌티바이러스 입자.

[0040] 실시형태 30: 실시형태 29에 있어서, 상기 바이러스 입자는 실시형태 1 내지 18 중 어느 하나에 따른 렌티바이러스 벡터를 사용하여 생성된 것인, 렌티바이러스 입자.

[0041] 실시형태 31: FoxP3 발현이 결핍된 포유동물에서 조절 T 세포(Treg) 기능을 회복시키는 방법으로서, 상기 방법은

[0042] 상기 대상체 유래의 줄기 세포 및/또는 전구 세포를 실시형태 1 내지 18 중 어느 하나에 따른 렌티바이러스 벡터 및/또는 실시형태 29 내지 30 중 어느 하나에 따른 바이러스 입자를 이용하여 형질도입시키는 단계; 및

[0043] 이로부터 유래된 상기 형질도입된 세포 또는 세포들을 상기 대상체 내로 이식하되, 상기 세포 또는 이로부터의 유도체는 상기 인간 FoxP3 유전자를 발현하고 상기 포유동물에서 조절 T 세포(Treg) 기능을 회복시키는 단계

[0044] 를 포함하는, 방법.

[0045] 실시형태 32: 대상체에서 자가면역 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은, 상기 대상체 유래의 줄기 세포 및/또는 전구 세포를 실시형태 1 내지 18 중 어느 하나에 따른 렌티바이러스 벡터 및/또는 실시형태 29 내지 30 중 어느 하나에 따른 바이러스 입자를 이용하여 형질도입시키는 단계; 및 이로부터 유래된 상기 형질도입된 세포 또는 세포들을 상기 대상체 내로 이식하되, 상기 세포 또는 이로부터의 유도체는 상기 인간 FoxP3 유전자를 발현하고 상기 자가면역 장애의 하나 이상의 증상을 개선하고/하거나 상기 자가면역 장애를 제거하는 단계를 포함하는, 방법.

[0046] 실시형태 33: 실시형태 32에 있어서, 상기 자가면역 장애는 중증 근무력증, 다발성 경화증, 면역 조절이상, 다발성 내분비병증 장병증 X-연관(IPEX), 및 자가면역성 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 장애를 포함하는, 방법.

[0047] 실시형태 34: 실시형태 30 내지 33 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 또는 이로부터의 유도체는 FoxP3의 정상적인 생리적 발현을 반복하는, 방법.

[0048] 실시형태 35: 실시형태 30 내지 34 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 줄기 세포인, 방법.

[0049] 실시형태 36: 실시형태 30 내지 34 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 골수로부터 유래된 줄기 세포인, 방법.

[0050] 실시형태 37: 실시형태 30 내지 34 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 제대혈로부터 유래된 줄기 세포인, 방법.

[0051] 실시형태 38: 실시형태 30 내지 34 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 말초 혈액 줄기 세포인, 방법.

[0052] 실시형태 39: 실시형태 30 내지 34 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 인간 조혈 전구 세포인, 방법.

[0053] 실시형태 40: 실시형태 39에 있어서, 상기 인간 조혈 전구 세포는 $CD34^+$ 세포인, 방법.

[0054] 실시형태 41: 실시형태 40에 있어서, 상기 인간 조혈 전구 세포는 $CD34^{+/}CD38^-$ 세포인, 방법.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1의 패널 A 및 B는 FoxP3 리포터 벡터가 인간 세포주에서 TReg 계통 특이적 발현을 나타냄을 보임. 패널 A) 3가지 상이한 세포주, 즉 MT-2(T-reg 유사), 주르카트(Jurkat)(T-세포), 및 K562(적혈구)에서 내인성 FoxP3 단백질 발현의 유세포분석 측정 결과. 적색 히스토그램은 foxP3 발현을 나타내고, 회색 히스토그램은 아이소타입 대조군 염색된 세포의 형광을 도시한다. 패널 B) FoxP3-m스트로베리(Strawberry) 리포터 벡터를 이용하여 형질도입된 MT-2, 주르카트, 또는 K562 세포에서 m스트로베리 리포터 단백질의 발현. Y-축은 m스트로베리 발현에 대해 양성인 세포의 백분율을 나타내는 한편, x-축은 세포당 벡터 복제물의 수를 나타낸다.

도 2의 패널 A 및 B는 FoxP3 리포터 벡터가 뮤린 유사유전자형 이식 모델에서 TReg 계통 특이적 발현을 나타냄을 보임. 패널 A) 이식 설정: CD45.2 FoxP3-GFP 유전자이식 마우스(FoxP3 및 GFP를 공동발현함)를 골수 공여자로서 사용하였다. lin- 세포를 CD45.2 FoxP3-GFP 마우스로부터 단리하고 FoxP3-m스트로베리 리포터 벡터를 이용하여 형질도입하였다. 형질도입된 lin- 세포를 치사량으로 조사된 유사유전자형 CD45.1 수용자에게 이식하였다. CD45.2 공여자 세포를 Treg 계통(FoxP3-GFP로 표시)에서 m스트로베리 리포터 벡터 발현에 대해 이식 후 10주째에 분석하였다. 패널 B) m스트로베리 리포터 발현을 이식받은 마우스의 골수, 비장, 및 흉선에서의 FoxP3-(GFP-) 및 FoxP3+(GFP+) 공여자 세포에서 측정하였다. Y 축은 각각의 집단에서 m스트로베리+ 세포의 백분율을 나타낸다.

도 3의 패널 A 내지 D는 FoxP3 리포터 벡터가 인간화 마우스 모델에서 TReg 계통 특이적 발현을 나타냄을 보임. 패널 A) 실험 설정: 인간 제대혈로부터 단리한 CD34+ 세포를 FoxP3m스트로베리 리포터 벡터를 이용하여 형질도입하고 신생아 면역-결핍 NSG 마우스에게 이식하였다. 이식 후 12주째에, 생착된 hCD45+ 세포를 m스트로베리 발현에 대해 분석하였다. 패널 B) 생착된 hCD45+ 세포에서 계통 특이적 m스트로베리 발현. NSG 골수(CD19+ B 세포, CD33+ 골수 세포, CD34+ 줄기 세포 및 전구 세포, 및 CD3+ T 세포), 흉선(CD4-CD8- 이중 음성[DN], CD4+CD8+ 이중 양성[DP], CD4CD8+ 단일 양성[CD8 SP], CD4+CD8-CD25-[CD4 Tconv 세포], 및 CD4+CD8-CD25+[Treg]), 및 비장(CD8 T 세포, CD4+CD25- Tconv 세포 및 CD4+CD25+ Treg 세포)에서 계통 마커에 의해 hCD45+ 세포를 게이팅하였다(gated). 히스토그램은 각각의 계통 내에서 m스트로베리 발현을 나타낸다. 점선은 "m스트로베리 높음"에 대한 컷오프를 나타낸다. 패널 C) 각각의 hCD45+ 계통에서 m스트로베리가 높은 세포의 백

분율. N은 분석된 조직당 10 내지 14마리 마우스이다. 데이터는 상이한 제대혈 CD34+ 공여자를 사용한 2가지의 독립적인 실험을 나타낸다. 패널 D) 인간화 마우스에서 FoxP3 및 m스트로베리의 공동발현. 이식받은 NSG-SGM3 마우스 유래의 인간 CD4+ 세포를 m스트로베리 발현에 기초하여 분류한 다음, FoxP3 발현에 대하여 세포내 염색 및 유세포분석을 수행하였다. 좌측 패널은 m스트로베리 발현에 의한 인간 CD4+ 세포의 분류를 나타내고, 우측 패널은 각각의 분류된 집단 내에서 FoxP3 발현을 나타낸다.

도 4의 패널 A 내지 C는 FoxP3-결핍 뮤린 HSC로의 계통 특이적 FoxP3 코딩 벡터의 도입이 기능적 Treg 발생을 회복한다는 것을 보임. 패널 A) 실험 설정: lin- 세포를 FoxP3 결핍(스컬피(scurfy)) 공여자 마우스로부터 단리하고 FoxP3 cDNA 및 리포터 m스트로베리를 둘 다 발현하는 FoxP3 코딩 벡터를 이용하여 형질도입하였다. 형질도입된 lin- 세포를 치사량으로 조사된 WT CD45.1 유사유전자형 수용자에서 이식하였다. 12주 후, m스트로베리+ 세포("보정한 Treg")를 Treg 억제 능력(패널 B) 및 Treg 표면 마커 발현(패널 C)에 대하여 평가하였다. 각각의 실험에 있어서, 스컬피 마우스 유래의 보정한 Treg를 WT FoxP3-GFP 마우스 유래의 천연 GFP+ Treg와 비교하였다. 패널 B) 분류된 Treg(nTreg = 천연 GFP+ Treg 또는 cTreg = 보정한 m스트로베리 Treg)를 비드-결합된 CD3/CD28 항체의 존재 하에서 세포 추적 바이올렛(Cell Trace Violet)으로 표지된 CD4+FoxP3- 반응자(responder) 세포와 공동 배양하였다. Treg를 Tresp 세포와 1:1의 비율로 배양하였다. 배양 4일 후, 각각의 그룹에서 표지된 반응자 세포의 분열 지수를 계산함으로써 Treg 억제를 결정하였다. 데이터는 1 내지 2개의 복제 웰로부터의 평균 +/- SEM을 나타낸다. 패널 C) WT FoxP3-GFP 마우스(상부) 또는 생착된 CD45.2 보정한 공여자 스컬피 세포(하부) 유래의 흉선세포. 우측 패널은 각각의 게이팅된 CD4 SP 흉선세포 집단(GFP-, GFP+, m스트로베리-, 또는 m스트로베리+)에서 Treg 표면 마커(CD25, GITR, 및 CTLA4)의 발현을 나타낸다.

도 5의 패널 A 내지 E는 계통 특이적 FoxP3 cDNA 벡터가 스컬피 마우스(FoxP3-결핍 마우스 모델)를 구제할 수 있는 기능적 Treg를 생성한다는 것을 보임. 패널 A) 실험 설정: 스컬피 또는 WT HSPC(CD45.2)를 FoxP3 리포터 벡터 또는 FoxP3 cDNA 벡터를 이용하여 형질도입하고 치사량으로 조사된 유사유전자형(CD45.1) 수용자에게 이식하였다. 이식 후 12주째에, 공여자 CD45.2+CD4+ 세포(추정 Treg를 함유함)를 이식 수용자의 비장으로부터 정제하고, 스컬피 신생아에게 간내(intrahepatically) 주사하였다. CD4 T 세포의 전달 후 21일째에 스컬피 신생아의 구제를 평가하였다. 패널 B) 21일째에 구제된 스컬피 신생아 유래의 비장 CD4 세포: 좌측 플롯은 Sf-Treg(보정하지 않음)를 받은 스컬피 마우스를 나타내는 한편, 우측 플롯은 cSf-Treg(보정함)를 받은 스컬피 마우스를 나타낸다. Y-축은 인간 FoxP3 발현(FoxP3 LV에 의해 암호화됨)을 나타내는 한편, x-축은 뮤린 FoxP3 발현(스컬피 마우스 둘 다에 부재)을 나타낸다. 패널 C) 구제된 스컬피 마우스 또는 WT 한배새끼 대조군에 있어서 비장 대 체중 비율. 패널 D) 21일째에 구제된 스컬피 신생아에서 비장 CD4 T 세포의 표현형. 적색 박스는 CD44+CD62L-(활성화) CD4 T 세포를 강조표시하는 한편, 청색 박스는 CD44-CD62L+(미경험) CD4 T 세포를 강조표시한다. 패널 E) 21일째에 구제된 스컬피 신생아의 사진. 백색 화살표는 귀의 기형 보정을 강조표시한다.

도 6은 pCCL-CNSp-FOXP3-3UTR-A2 벡터(서열번호 1(접합 마커 유래의 서열))의 구조. 인간 게놈 기원의 서열: 문헌[Tone *et al.* (2008) Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nature Immunology,* 9: 194-202]을 기반으로 하는(그러나, 상기 문헌에 기재된 서열과 동일하지 않는) 최소 서열인 CNS1(237 bp); 문헌[Kim and Leonard (2007) CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *JEM*, 204: 1543-1551]에서 공개된 CNS2(359 bp); 문헌[Zheng *et al.*(2010) Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate, *Nature* 473: 808-813]에서 공개된 CNS3(217 bp); 상기 문헌[Kim and Leonard (2007)]에서 변형된 서열인 프로모터(382 bp); 인간 게놈 NCBI 기준 서열 파일 NM_014009에 기반한 5'UTR(187 bp); 인간 게놈 NCBI 기준 서열 파일 NM_01009에 기반한 FoxP3 cDNA(1292 bp); 인간 게놈 NCBI 기준 서열 파일 NM_014009에 기반한 3'UTR(875 bp).

도 7은 FoxP3 렌티바이러스 벡터의 성분의 예시.

도 8의 패널 A 내지 F는 구성적 FoxP3 발현이 HSPC 생착을 손상시킨다는 것을 보임. 패널 A) 형질도입 후 3일째에 대조군 LV(MNDU3-GFP) 또는 구성적 FoxP3 LV(MNDU3-FoxP3-IRES-GFP)를 이용하여 형질도입된 뮤린 lin- HSPC에서 생존력 및 GFP 발현. 패널 B) 이식 후 7일째에 대조군 LV(MNDU3-GFP) 또는 구성적 FoxP3 LV(MNDU3-FoxP3-IRES-GFP)를 이용하여 형질도입된 공여자(CD45.1) lin- HSPC의 말초 혈액 생착. FACS 플롯은 공여자(CD45.1) 생착 및 공여자 세포에서 GFP 발현을 나타낸다(n=10마리 마우스/그룹). 패널 C) 이식 후 10일째 및 21일째에 이식된 마우스에서 백혈구(WBC), 적혈구(RBC) 및 혈소판 수(n = 그룹당 10마리 마우스). 패널 D) 이식 후 마우스의 생존. N=그룹당 10마리 마우스. 패널 E) 이식 후 3일째에 대조군 LV(MNDU3-GFP) 또는 구성적 FoxP3 LV(MNDU3-FoxP3-IRES-GFP)를 이용하여 형질도입된 CB CD34+ HSPC에서 생존력 및 GFP 발현. 패널 F) 이식 후 6

내지 8주째에 인간화 NSG 마우스에서 hCD45+ 세포의 말초 혈액 생착(총 hCD45+ + mCD45+의 백분율로 표시함). 데이터는 12마리의 독립된 공여자 유래의 CB CD34+ 세포로 인간화된 마우스를 나타내며, n= 그룹당 16 내지 17마리 마우스이다. 스튜던트 t-테스트. 데이터는 패널 B에 있어서 평균 ± SD, 패널 C에 있어서 평균 ± SEM, 및 패널 F에 있어서 중앙값 ± IQR 및 범위를 나타낸다. 패널 C 및 F에서의 데이터는 스튜던트 t-테스트를 사용하여 분석하였다. (D)에서의 데이터는 로그-순위(만텔-콕스(Mantel-Cox)) 검정을 사용하여 분석하였다. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

도 9a 및 9b는 계통 특이적 FoxP3 발현을 위한 렌티바이러스 벡터의 설계의 예시. 도 9a: 내인성 인간 FOXP3 유전자는 벡터에 포함된 조절 영역(프로머터, CNS1, CNS2, CNS3, 및 3' UTR)의 위치를 나타낸다. 도 9b: 벡터 맵은 pCCL 벡터 백본 내의 CNS123p-m스트로베리 및 CNS123p-FoxP3-m스트로베리 작제물의 설계를 나타낸다. CNS123p-m스트로베리는 m스트로베리의 발현을 구동한다. CNS123p-FoxP3-m스트로베리는 m스트로베리에 연결된 FoxP3 cDNA P2A의 발현을 구동한다.

도 10의 패널 A 내지 E. FoxP3 리포터 LV는 Treg 계통 특이적 발현을 보인다. 패널 A) CNS123p-m스트로베리를 이용하여 형질도입된 인간 조혈 세포주의 분석. 좌측 패널의 히스토그램은 각각의 세포주의 내인성 FoxP3 상태를 나타낸다. 우측 패널의 히스토그램은 CNS123p-m스트로베리를 이용하여 형질도입된 각각의 세포주에서 m스트로베리 발현을 나타낸다. 패널 B) 벡터 복제수의 범위에 걸친 인간 조혈 세포주에서의 m스트로베리의 발현. Y-축은 m스트로베리 발현에 대하여 양성인 세포의 백분율(좌측) 또는 m스트로베리 형광의 평균 강도(우측)를 나타내는 한편, x-축은 세포당 벡터 복제물의 수를 나타낸다(n=세포주당 12). 패널 C) CNS123p-m스트로베리의 생체내 계통-특이적 발현을 평가하기 위한 실험 설계. 골수 공여자로서 CD45.2 FoxP3-GFP 유전자이식 마우스(이는 FoxP3 및 GFP를 공동 발현함)를 사용하였다. lin- HSPC를 CD45.2 FoxP3-GFP 마우스로부터 단리하고, CNS123p-m스트로베리를 이용하여 형질도입하였다. 형질도입된 lin- HSPC를 치사량으로 조사된 유사유전자형 CD45.1 수용자에게 이식하였다. 각각의 조혈 계통 내의 CD45.2 공여자 세포를 이식 후 20주째에 m스트로베리 리포터 벡터 발현에 대하여 분석하였다. 패널 D) 히스토그램은 이식받은 마우스의 골수, 흉선, 및 비장의 각각의 조혈 계통에서 m스트로베리 리포터 발현을 도시한다. 각각의 개별 히스토그램 선은 개별 마우스(n=9마리 마우스)에 대하여 명시된 계통에서 m스트로베리 발현을 나타낸다. 패널 E) Y 축은 BM, 비장, 및 흉선의 각각의 조혈 계통 내 m스트로베리+ 세포의 백분율을 나타낸다(n=9마리 마우스). 패널 E의 데이터는 평균 ± SD를 나타낸다.

도 11의 패널 A 내지 F. 계통-특이적 FoxP3 발현은 스컬피(FoxP3-결핍) HSC로부터 Treg 발달을 회복시킨다. 패널 A) Treg 발달을 평가하기 위한 이식 설정: lin- HSPC를 FoxP3-결핍(스컬피) 또는 야생형(FoxP3-GFP) 공여자 마우스로부터 단리하고 CNS123p-m스트로베리 또는 CNS123p-FoxP3-m스트로베리를 이용하여 형질도입하였다. 형질도입된 lin- HSPC를 치사량으로 조사된 WT CD45.1 유사유전자형 수용자에게 이식하였다. 12주 후, 각각의 이식 코호트로부터의 공여자 세포를 Treg의 흉선 및 비장 재구성에 대하여 평가하였다. 각각의 그룹으로부터의 Treg 집단을 CD4+m스트로베리+ 세포(보정하지 않은 스컬피 Treg[Sf-Treg], 보정한 스컬피 Treg[cSf-Treg]) 또는 CD4+GFP+ 세포(야생형 Treg[WT-Treg])로서 확인하였다. 패널 B) Sf, cSf, 또는 WT BM lin- 세포로 재구성된 마우스에서 총 공여자 흉선세포의 계통 분포(n=3 내지 5마리 마우스/그룹). 패널 C) 흉선 Treg 재구성. FACS 플롯은 이식 수용자의 흉선에서 공여자 CD45.2+CD4SP 세포를 나타낸다. 게이트는 흉선 Sf-Treg, cSf-Treg, 및 WT-Treg를 표시한다. 하부 패널은 각각의 추정 Treg 집단 내에서 Treg 표면 마커 CD25, GITR, 및 CTLA4의 발현을 나타낸다. 표면 마커 발현에 있어서, Sf-Treg 및 cSf-Treg는 m스트로베리 발현의 상위 50%를 발현하는 세포로 정의된다. 히스토그램은 3가지 중 대표적인 한가지 실험을 도시한다. 패널 D) 비장 Treg 및 Tconv 분류. 비장 Treg 집단(m스트로베리+ 또는 GFP+ 게이트)을 Treg 억제 분석을 위해 FACS 분류하였다. Tconv 집단(m스트로베리- 또는 GFP- 게이트)을 iTreg 유도 분석을 위해 분류하였다. 패널 E) 시험관 내 Treg 억제 분석. 분류된 Treg(패널 D에 나타냄)를 비드-결합 CD3/CD28 항체의 존재 하에서 1:1의 비율로 반응자 T 세포(Tresp, 형광 증식 염료로 표지한 유사유전자형 WT CD4+ 세포)와 공동 배양하였다. 배양 3일 후, 유세포분석법에 의한 증식 염료의 희석에 의해 Tresp 증식을 결정하였다. 히스토그램은 3가지 대표적 실험 중 하나에서 Tresp 증식을 나타낸다. 막대 그래프는 각각의 Treg 배양 조건에 대한 증식 지수를 나타낸다(n = 그룹당 6 내지 9, 그룹 당 3가지 상이한 Treg 공급원 유래, 각각의 실험에 대하여 내부 "Treg 없음" 대조군에 대하여 데이터를 정규화함). 패널 F) 분류된 비장 Tconv 세포(패널 D에 나타냄)를 4일 동안 20 ng/㎖ IL-2 및 20 ng/㎖ TGFβ의 존재 하에서 CD3/CD28 항체로 활성화시켜 iTreg를 유도하였다. FACS 플롯은 각각의 그룹에서 m스트로베리 또는 GFP 발현을 나타낸다(n=3마리 마우스/그룹). 패널 B, C, E, 및 F의 데이터는 평균 ± SD로 제시된다. 패널 B의 데이터는 각각의 계통에 대해 크루스칼왈리스 검정(Kruskal Wallis test)에 의해 분석하였다. 패널 E의 데이터는 모든 그룹에 대한 전체 비교를 위해 크루스칼왈리스 검정, 및 쌍별 비교를 위한 맨-휘트니 U 검정(Mann-Whitney U test)

에 의해 분석하였다. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS, 유의하지 않음.

도 12의 패널 A 내지 E. 계통-특이적 FoxP3 cDNA 벡터는 스컬피 마우스를 구제할 수 있는 기능적 Treg를 생성한다. 패널 A) 실험 설정. 스컬피 또는 WT HSPC(CD45.2)를 CNS123p-m스트로베리 또는 CNS123p-FoxP3-m스트로베리를 이용하여 형질도입하고, 치사량으로 조사된 유사유전자형(CD45.1) 수용자에게 이식하였다. 이식 후 8주째에, 공여자 CD45.2+CD4+ 세포(추정 Treg를 함유함)를 이식 수용자의 비장으로부터 정제하고, 스컬피 신생아에게 복강내 주사하였다. 스컬피 신생아의 구제는 CD4 T 세포의 전달 후 21일째에 평가하였다. 패널 B) 21일째 구제된 스컬피 마우스의 사진. 백색 화살표는 cSf-Treg 및 WT-Treg의 스컬피 마우스 수용자에서의 귀 피부 염증의 보정을 강조표시하지만, Sf-Treg는 아니다. 패널 C) 구제된 스컬피 마우스 또는 WT 한배새끼 대조군에 대한 비장 대체중 비율(n=3가지의 독립적인 실험, 3 내지 6마리의 마우스/그룹). 패널 D) 구제된 스컬피 마우스 또는 WT 한배새끼 대조군의 비장에서 활성화된(CD44+CD62L-) CD4 T 세포의 백분율. 패널 E) 구제된 스컬피 마우스 또는 WT 한배새끼 대조군에서의 혈청 사이토카인 수준. 패널 C 내지 E의 데이터는 평균 ± SD로 제시된다. 패널 C, D, 및 E의 데이터는 모든 그룹에 대한 전체 비교를 위해 크루스칼왈리스 검정에 의해 분석하였고, 쌍별 비교를 위해 맨-휘트니 U 검정을 수행하였다. *p < 0.05, **p < 0.01, NS, 유의하지 않음.

도 13의 패널 A 내지 F. FoxP3 리포터 벡터는 인간화 마우스 모델에서 Treg 계통 특이적 발현을 나타낸다. 패널 A) 인간화 마우스 모델에 대한 실험 설정. CD34+ HSPC(정상적인 인간 제대혈 유래)를 CNS123p-m스트로베리를 이용하여 형질도입하고 신생아 NSG 마우스(패널 B, C, E, F) 또는 NSG-SGM3 마우스(패널 D)에게 이식하였다. 이식 후 12 내지 16주째에, 생착된 hCD45+ 세포를 m스트로베리 발현에 대해 분석하였다. 패널 B) 각각의 조혈 계통에서 m스트로베리 리포터 발현. 분석된 계통은 골수 CD34+ 줄기 및 전구 세포, CD19+ B 세포, CD33+ 골수 세포, 및 CD3+ T 세포, 흉선 CD4-CD8- 이중 음성(DN), CD4+CD8+ 이중 양성(DP), CD4-CD8+ 단일 양성(CD8 SP), CD4+CD8-CD25-(CD4 Tconv 세포), 및 CD4+CD8-CD25+(Treg) 및 비장 CD8 T 세포, CD4+CD25- Tconv 세포, 및 CD4+CD25+ Treg 세포를 포함한다. 각각의 중첩된 히스토그램은 개별 마우스에서 계통-한정된 m스트로베리 발현을 나타낸다(n=2가지 상이한 제대혈 CD34+ 공여자로 인간화된 10 내지 14마리 마우스). 패널 C) 패널 B에 나타낸 각각의 계통에서의 m스트로베리+ 세포의 백분율. 패널 D) 인간화 마우스의 FoxP3 및 m스트로베리의 공동 발현. 인간 CD4+ 세포를 이식받은 NSG-SGM3 마우스의 2개의 풀링된 비장으로부터 농축시켰다. CD4+ 세포를 m스트로베리+ 및 m스트로베리- 집단으로 FACS 분류한 다음, FoxP3 발현에 대해 세포내 염색을 수행하였다. FoxP3 세포내 염색 프로토콜 동안 m스트로베리 형광의 퀀칭으로 인해 FoxP3 분석 이전에 FACS 분류를 수행하였다. 좌측 패널은 m스트로베리 발현에 의한 인간 CD4+ 세포의 분류를 나타내는 한편, 우측 패널은 분류된 집단에서의 FoxP3 발현을 나타낸다. 결과는 2가지의 독립적인 실험을 대표한다. 패널 E) NSG 경쟁적 재증식 분석을 위한 실험 설정. "시험" CB CD34+ 세포를 CNS123p-m스트로베리 또는 CNS123p-FoxP3-m스트로베리를 이용하여 형질도입하는 한편, "경쟁자" CD34+ 세포를 UBC-m시트린(Citrine) 벡터를 이용하여 형질도입하였다. 시험 및 경쟁자 세포를 1:1의 비율로 NSG 신생아에게 공동 이식하고, 12주째에 BM에서 생착된 경쟁자(m시트린+) CD34+ 세포의 백분율을 각각의 그룹에 대해 결정하였다(n= 2가지의 상이한 CB CD34+ 공여자로부터 인간화된, 그룹당 6마리의 마우스). 패널 F) 인간화 마우스 유래의 T 세포 집단의 CNS2 메틸화 분석. 도면은 내인성 FOXP3 유전자 내 CNS2 및 바이러스 게놈 내 CNS2의 위치를 도시한다. 적색 화살표는 내인성 또는 바이러스 CNS2 영역의 증폭을 위한 차별적 프라이머 결합 부위를 나타낸다. CNS2의 확대 영역은 중아황산염 시퀀싱에 의한 메틸화 상태에 대해 분석한 9개의 CpG 부위를 도시한다. FACS 플롯은 3 내지 5마리의 인간화 마우스의 풀링된 비장으로부터 단리한 CD4 농축 세포에서 Treg(CD4+CD25+) 및 Tconv(CD4+CD25-) 집단을 정의하는 데 사용된 분류 게이트를 나타낸다. 열 지도는 내인성 및 바이러스 CNS2 내 9개의 CpG 부위 각각에서 검출된 메틸화된 판독물의 백분율을 나타낸다. 결과는 2가지의 상이한 CB CD34+ 공여자로부터 인간화된 풀링된 NSG 코호트를 사용하여 2가지의 독립적인 실험을 대표한다(도 18). 패널 E의 데이터는 평균 ± SD를 나타낸다. 패널 E의 데이터는 맨-휘트니 U 검정에 의해 분석하였으며, NS는 유의하지 않음을 나타낸다.

도 14. (도 10에 해당함): 뮤린 조혈 계통 게이팅의 유세포분석 정의가 비장(Gr1+, B220+, CD8+, CD4+FoxP3-, CD4+FoxP3+), 골수(cKit+), 및 흉선(DN, DP, CD8 SP, CD4+FoxP3-, CD4+FoxP3+)에서 각각의 정의된 집단에 대하여 나타내어져 있다.

도 15의 패널 A 및 B. 스컬피 신생아의 HSC 이식. 패널 A) lin- 세포를 이용한 HSC 이식 후 생존 곡선. 스컬피 또는 WT 신생아(d0 내지 d1)에 500 Rad로 조사한 다음, LV-변형된 lin- 세포를 간내 주사하였다. 각각의 새끼는 1마리의 공여자 마우스의 대퇴골 및 경골로부터 정제한 총 lin- 세포 용량을 받았다(1E6 내지 6E6 lin- 세포/마우스의 범위). WT lin- 세포 및 보정하지 않은 스컬피 lin- 세포를 CNS123p-m스트로베리 리포터 LV를 이용하여 형질도입하는 한편, 보정한 스컬피 lin- 세포를 CNS123p-FoxP3-m스트로베리 LV를 이용하여 형질도입하였다. 결

과는 처리 그룹당 6 내지 16마리의 총 마우스로 9마리의 이식된 함께 태어난 새끼들(스컬피 및 WT 한배새끼를 포함함)로부터의 풀링된 데이터를 나타낸다. 비생존 마우스는 자연적으로 죽거나 처치 그룹에 대해 모르는 수의사가 결정한 바에 따라 빈사 상태로 인해 안락사된 마우스이다. 패널 B) lin- 세포를 받은 스컬피 신생아에서 21일 말초 혈액 생착. 백분율은 총 CD45+(CD45.2 및 CD45.1/CD45.2) 세포의 백분율로서 CD45.2+ 공여자 세포를 나타낸다. 적색으로 표시된 기호는 연구가 끝날 때까지 생존한 마우스에서의 생착을 나타낸다(114일).

도 16의 패널 A 내지 D. (도 12에 해당함): 패널 A) 입양 전달(adoptive transter)을 위한 CD4 정제된 세포 산물의 특성화. "그룹"은 수용자 신생아(스컬피[Sf] 또는 야생형(WT]) + 주사된 세포 산물의 유전자형을 정의한다(PBS = 허위 PBS 주사, Sf-CD4 = 보정하지 않은 스컬피 CD4, cSf-CD4 = 보정한 스컬피 CD4, WT-CD4 = 야생형 CD4). 패널 B) 입양 전달 이전에 자기 비드 정제된 CD4+ 세포의 대표적인 FACS 분석. 플롯은 오염성 수용자 CD45.1+ 세포가 없는 고순도의 CD4+ 세포를 나타낸다. 패널 C) 실패한 스컬피 구제(cSf-CD4 VCN<2) 및 성공적인 스컬피 구제(cSf-CD4 >3)에서 활성화된 비장 CD4 세포의 비교. 패널 D) 수용자 마우스의 비장에서 CD4 활성화(CD44+CD62L-)를 억제하지 못한 cSf-CD4 산물(VCN <2임)의 특성화.

도 17의 패널 A 및 B. (도 13에 해당함): 인간화 NSG 마우스에서 인간 조혈 계통의 유세포분석 특성화. 패널 A) 게이팅은 비장(CD8+, CD4+CD25-, D4+CD25+), 골수(CD33+, CD19+, CD3+, CD34+), 및 흉선(DN, DP, CD8 SP, CD4+CD25-, CD4+CD25+)에서 각각의 정의된 집단에 대해 나타내어져 있다. 패널 B) NSG 골수에서 생착된 인간 세포의 계통 분포. 백분율은 총 hCD45+ 세포의 백분율로서 각각의 계통의 상대적인 기여를 나타낸다. n= 2가지의 독립적인 실험으로부터 풀링된 13마리의 마우스.

도 18의 패널 A 내지 C. (도 13에 해당함): 내인성 및 바이러스 CNS2의 메틸화 분석. 패널 A) FoxP3 CNS2 내 9개의 CpG 부위에서 메틸화 판독물의 백분율은 FoxP3 LV-변형 CD34+ 세포로 인간화된 NSG 마우스로부터 분류된 Treg 및 Tconv 세포에 대하여 나타내어져 있다. 값은 암컷 제대혈 CD34+ 세포를 사용하여 2가지의 독립적인 실험에 대해 나타내어져 있다. 상단 행은 내인성 CNS2에 대한 메틸화 판독물의 절대수를 나타낸다. 중간 행은 2X 염색체의 기준선 50% 메틸화를 차지하는 내인성 CNS2에 대한 정규화된 판독을 나타낸다. 하단 행은 바이러스 CNS2의 메틸화 판독물 백분율을 나타낸다. 패널 B) FoxP3 CNS2 메틸화 분석에 대한 분석 대조군. FoxP3 cDNA LV 게놈을 암호화하는 플라스미드 DNA를 양성 대조군으로서 CpG 메틸트랜스퍼라제로 처리하는 한편, 비처리 cDNA LV 플라스미드를 음성 대조군으로서 사용하였다. 바이러스 CNS2 부위에 대하여 파이로시퀀싱 프라이머를 사용하여 샘플을 CpG 메틸화에 대하여 분석하였다. 대조군은 바이러스 CNS2 프라이머를 이용하여 각각의 CpG 부위에서 메틸화의 전체 범위를 검출하는 파이로시퀀싱 메틸화 분석의 능력을 입증한다. 패널 C) FoxP3 cDNA 벡터를 이용하여 형질도입된 주르카트 및 MT2 세포에서 내인성 및 바이러스 FoxP3 CNS2의 메틸화 분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 다양한 실시형태에서, FoxP3의 생리적 유전자 발현을 조절하는 내인성 유전자 요소를 사용하여 FoxP3을 발현하는 렌티바이러스 벡터뿐만 아니라, 이와 같은 벡터의 용도가 본 명세서에서 제공된다. 구체적으로, 다양한 실시형태에서, FoxP3의 유전적 결함(예를 들어, IPEX 질환)을 치료하거나 다른 자가면역 및 자가염증 병태(예를 들어, 염증성 장 질환, 1형 당뇨병, SLE, JRA, 다발성 경화증 등)을 치료하기 위해 코돈-최적화된 FoxP3 유전자 또는 cDNA를 발현시키기 위해 인간 FoxP3 유전자 유래의 내인성 전사 제어 요소를 사용하는 렌티바이러스 벡터가 제공된다. 이러한 벡터는 이들 서열을 자가 조혈모세포에 도입하여 적절한 성숙한 림프구에서 FoxP3 유전자 산물의 정상적인 생리적 발현 패턴을 반복하는 데 사용될 수 있다.

[0057] 이러한 접근법은 비특이적 인핸서/프로모터를 사용하여 다수의 혈액 세포 유형에서 이소성 발현을 유발하고 원치않는 효과를 유발할 수 있는 이들 유전자의 구성적 발현을 구동하는 유전자 전달 벡터와 대조적이다. 내인성 전사 제어 요소의 사용은 유전자의 정밀하고 정확한 예상대로의 발현을 유발하여 정상적인 발현 패턴을 모방한다. 이는 예를 들어 하기 기재된 바와 같이 다양한 임상 환경에서 상당한 치료적 이점을 초래하는 것으로 여겨진다.

[0058] 스커핀(scurfin)으로도 알려진 FOXP3(포크헤드 박스(forkhead box) P3)은 면역계 반응에 관여하는 단백질이다(Brunkow *et al.*(2001) *Nat. Genet.* 27(1): 68-73). FOX 단백질 패밀리의 구성원인 FOXP3은 조절 T 세포의 발달 및 기능에서 조절 경로의 마스터 조절자로서 작용하는 것으로 보인다(예를 들어, 문헌[Hori *et al.* (2003) *Science*, 299(5609): 1057-1061]; [Fontenot *et al.*(2003) *Nat. Immunol.*, 4(4): 330-336; Fontenot *et al.*(2005) *Immunity*, 22(3): 329-341] 참조). 조절 T 세포는 일반적으로 면역 반응을 감소시킨다. 자가면역 질환에서, 조절 T 세포 활성의 결핍은 다른 자가면역 세포가 신체 자신의 조직을 공격할 수 있게 한다(예를 들어, 문헌[Josefowicz *et al.*(2012) *Ann. Rev. Immunol.* 30: 531-564]; [Zhang *et al.* (2007) *J. Cell. Physiol.*

211(3): 590-597] 참조).

[0059] 조절 T 세포(Treg)는 면역 반응을 조절하고 면역관용을 유지하는 데 중추적인 역할을 한다. Treg 입양 전달 요법은 다양한 면역학적 장애에 대한 임상적 치료를 제공할 것으로 예상된다(예를 들어, 문헌[Sakaguchi *et al.* (2006) *Immunol. Rev.* 212: 8-27]; [Sakaguchi *et al.*(2008) *Cell*, 133(5): 775-787]; [Liston and Gray (2014) *Nat. Rev. Immunol.* 14(3): 154-165] 참조). Treg는 주로 2가지 상이한 경로를 통해 생성된다. 첫번째는 친화도가 높은 흉선 항원 제시에 의해 흉선의 Treg 전구 세포로부터의 직접적인 발달을 통한 것이다. 이러한 Treg는 천연 발생 Treg(nTreg) 또는 흉선 Treg(tTreg)로 불린다. 두번째는 전환 성장 인자(TGF)-β를 이용한 항원 제시에 의해 말단에서 미경험 CD4 T 세포로부터의 분화를 통한 것이다. 이들 Treg는 시험관 내 유도된 Treg(iTreg) 또는 말단에서 유도된 Treg(pTreg)로 불린다(예를 들어, 문헌[Chen *et al.* (2003) *J. Exp. Med.* 198(12): 1875-1886]; [Josefowicz and Rudensky (2009) *Immunity*, 30(5): 616-625] 참조). 두 가지 Treg 모두 유사한 억제 활성을 가지며, Treg에 대한 마스터 전사 인자인 포크헤드 박스 P3(Foxp3)을 현저하게 발현시킨다. Foxp3 발현은 Treg 특징 유전자를 발현시키고 이펙터 T 세포(Teff) 유전자를 억제함으로써 Treg 기능의 유지 및 분화를 위해 필요하다(예를 들어, 문헌[Bennett *et al.* (2001) *Nat. Genet.* 27(1): 20-21]; [Hori *et al.* (2003) *Science*, 299(5609): 1057-1061]; [Fontenot *et al.* (2003) *Nat. Immunol.* 4(4): 330-336]; [Bettelli *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(14): 5138-5143]; [Ichiyama *et al.* (2008) *J. Biol. Chem.* 283(25): 17003-17008] 참조).

[0060] T_{reg} 세포의 기능 감소는 인간 및 마우스에서 다양한 자가면역 장애와 연관되어 있다(Paust and Cantor (2005) *Immunol. Rev.* 204: 195-207). Foxp3 발현의 수준 감소는 T_{reg} 기능 손상과 상관관계가 있으며, 중증 근무력증 및 다발성 경화증과 같은 자가면역 질환에서 발견되었다(예를 들어, 문헌[Huan *et al.*(2005) *J. Neurosci. Res.* 81: 45-52]; [Balandina *et al.* (2005) *Blood*, 105: 735-741] 참조). T_{reg} 기능의 가장 뚜렷한 결핍은 인간 자가면역 질환 IPEX(면역 조절이상, 다발성 내분비병증, 장병증, X-연관) 및 스컬피 마우스에서 상응하는 질환(예를 들어, 문헌[Levy-Lahad and Wildin (2001) *J. Pediatr.* 138: 577-580]; [Godfrey *et al.* (1991) *Am. J. Pathol.* 138: 1379-1387] 참조)에서 관찰된다. 이환된 수컷은 $CD4^+$ T 세포에 의해 매개되는 치명적인 다기관 림프구증식성 질환을 앓는다(예를 들어, 문헌[Clark *et al.* (1999) *J. Immunol.* 162: 2546-2554]; [Blair *et al.*(1994) *J. Immunol.* 153: 3764-3774] 참조). 기능에 영향을 미치는 Foxp3 유전자에서의 돌연변이는 IPEX 및 스컬피 질환의 분자적 기초가 되는 것으로 밝혀졌다.

[0061] 전술한 관점에서, 본 명세서에 기재된 FoxP3을 발현하는 렌티바이러스 벡터는 FoxP3 발현 결핍이 있는 포유동물에서 조절 T 세포(Treg) 기능을 회복시키는 데 효과적으로 사용될 수 있는 것으로 여겨진다. 유사하게, 본 명세서에 기재된 FoxP3을 발현하는 렌티바이러스 벡터는 대상체에서 자가면역 장애를 치료하는 데 효과적으로 사용될 수 있는 것으로 여겨진다. 특정 실시형태에서, 자가면역 장애는 FoxP3 발현의 감소 및/또는 FoxP3 돌연변이로 특징지어지는 자가면역 장애이다. 예시적인 자가면역 장애는 중증 근무력증, 다발성 경화증, IPEX(면역 조절이상, 다발성 내분비병증, 장병증, X-연관), 자가면역성 관절염 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0062] 일반적으로, 본 방법은 내인성 FoxP3 프로모터(및 특정 실시형태에서, FoxP3 인핸서(예를 들어, CNS1, 및/또는 CNS2, 및/또는 CNS3))의 제어 하에서 FoxP3 유전자 또는 cDNA를 포함하는 본 명세서에 기재된 렌티바이러스 벡터를 사용하여 이들 서열을 자가 조혈모세포에 도입하는 것을 포함한다. 형질도입된 세포를 대상체에게 재도입하고, 여기서 상기 세포가 적절한 성숙한 림프구에서 FoxP3 유전자 산물의 정상적인 생리적 발현 패턴을 반복함으로써 질환을 개선 및/또는 치료한다.

[0063] 다양한 실시형태에서, 재조합 렌티바이러스 벡터(LV)가 제공되며, 여기서 벡터는 내인성 FoxP3 프로모터에 작동 가능하게 연결된 인간 FoxP3 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 작제물을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 예시적이지만 비제한적인 특정 실시형태에서, 상기 LV는 TAT-독립적 자가-불활성화(SIN) 렌티바이러스 벡터이다. 특정 실시형태에서, 인간 FoxP3 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 FoxP3 cDNA를 포함한다. 특정 실시형태에서, 인간 FoxP3 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 하나 이상의 FoxP3 인핸서 요소(예를 들어, FoxP3-CNS1, 및/또는 FoxP3-CNS2, 및/또는 FoxP3-CNS3)에 작동 가능하게 연결된다. 예시적이지만 비제한적인 하나의 벡터는 도 6 및 7에 나타내어져 있으며, 일 실시형태에서 벡터는 표 1에 나타낸 서열(서열번호 1)을 포함한다.

[0064] 본 명세서에 기재된 벡터, 및 본 명세서에 기재된 벡터를 사용하여 생성된 바이러스 입자를 포함하는 패키징 세포가 또한 제공된다.

[0065] **TAT-독립적 자가 불활성화 렌티바이러스 벡터.**

[0066] 안전성을 추가로 개선시키기 위해, 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된, 내인성 프로모터의 제어 하에 인간 FoxP3 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 LV는 TAT-독립적, 자가-불활성화(SIN) 구성을 포함한다. 따라서, 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LV에서 야생형 LTR에 비해 프로모터 활성이 감소된 LTR 영역을 이용하는 것이 바람직하다. 생물안전성 특성을 제공하는 효과적으로 "자가-불활성화"(SIN)하는 이와 같은 작제물이 제공될 수 있다. SIN 벡터는 형질도입된 세포에서 전장 벡터 RNA의 생성이 크게 감소되거나 완전히 없어진 것이다. 이러한 특성은 복제-가능 재조합체(RCR)가 생길 위험을 최소화한다. 또한, 이는 벡터 통합 부위에 인접하여 위치한 세포 코딩 서열이 비정상적으로 발현할 위험을 감소시킨다.

[0067] 또한, SIN 설계는 이식유전자의 발현을 구동시키는 프로모터와 LTR 사이의 간섭 가능성을 감소시킨다. SIN LV는 종종 내부 프로모터의 완전한 활성을 가능하게 할 수 있다.

[0068] SIN 설계는 LV의 생물안전성을 증가시킨다. HIV LTR의 대부분은 U3 서열로 구성된다. U3 영역은 감염된 세포에서 및 세포 활성화에 반응하여 HIV 게놈의 기저 및 유도된 발현을 조절하는 인핸서 및 프로모터 요소를 함유한다. 이러한 프로모터 요소의 몇몇은 바이러스 복제에 필수적이다. 인핸서 요소 중 일부는 바이러스 단리물 사이에 고도로 보존되어 있으며, 바이러스 발병기전에서 중요한 병독성 인자로 연루되어 있다. 인핸서 요소는 바이러스의 상이한 세포 표적에서 복제 속도에 영향을 미치도록 작용할 수 있다.

[0069] 바이러스 전사는 5' LTR의 U3 영역의 3' 말단에서 시작하므로, 이들 서열은 바이러스 mRNA의 일부가 아니며, 3' LTR 유래의 이의 복제물은 통합된 프로바이러스에서 LTR 둘 다의 생성을 위한 주형으로 작용한다. U3 영역의 3' 복제물이 레트로바이러스 벡터 작제물에서 변경되는 경우, 벡터 RNA는 여전히 생산자 세포에서 온전한 5' LTR로부터 생성되지만, 표적 세포에서 재생될 수 없다. 이와 같은 벡터의 형질도입은 자손 바이러스에서 LTR 둘 다의 불활성화를 초래한다. 따라서, 레트로바이러스는 자가-불활성화(SIN)이고, 이들 벡터는 SIN 전달 벡터로 알려져 있다.

[0070] 특정 실시형태에서, 자가-불활성화는 벡터 DNA의 3' LTR의 U3 영역, 즉 벡터 RNA를 생성하는 데 사용되는 DNA에서 결실의 도입을 통해 달성된다. RT 동안, 이러한 결실은 프로바이러스 DNA의 5' LTR로 전달된다. 전형적으로, 충분한 U3 서열을 제거하여 LTR의 전사 활성을 크게 감소시키거나 완전히 없앰으로써, 형질도입된 세포에서 전장 벡터 RNA의 생성을 크게 감소시키거나 없애는 것이 바람직하다. 그러나, 일반적으로 바이러스 RNA의 폴리아데닐화에 관여하는 LTR의 요소를 유지하는 것이 바람직하며, 기능은 전형적으로 U3, R 및 U5에 퍼져있다. 따라서, 특정 실시형태에서, 폴리아데닐화 결정자를 아끼면서 LTR로부터 전사적으로 중요한 모티프를 가능한 한 많이 제거하는 것이 바람직하다.

[0071] SIN 설계는 문헌[Zufferey *et al.* (1998) *J Virol.* 72(12): 9873-9880], 및 미국 특허 5,994,136에 상세히 기재되어 있다. 그러나, 여기에 기재된 바와 같이, 3' LTR에서 결실의 정도에 제한이 있다. 먼저, U3 영역의 5' 말단은, 벡터 전달에서 또 다른 필수적인 기능을 제공하며, 이는 통합에 필요하다(말단 다이뉴클레오타이드+att 서열). 따라서, 말단 다이뉴클레오타이드 및 att 서열은 결실될 수 있는 U3 서열의 5' 경계를 나타낼 수 있다. 추가적으로, 일부 엄격하지 않게 한정된 영역은 R 영역에서 하류 폴리아데닐화 부위의 활성에 영향을 미칠 수 있다. 3' LTR 유래 U3 서열의 과도한 결실은 벡터 전사체의 폴리아데닐화를 감소시킬 수 있으며, 이는 생산자 세포에서 벡터의 역가 및 표적 세포에서 이식유전자 발현 둘 다에 불리한 결과를 초래한다.

[0072] 추가적인 SIN 설계는 미국 특허 공개 2003/0039636에 기재되어 있다. 여기에 기재된 바와 같이, 특정 실시형태에서, LTR로부터 제거된 렌티바이러스 서열은 비-렌티바이러스 레트로바이러스 유래의 비슷한 서열로 대체되어, 하이브리드 LTR을 형성한다. 구체적으로, LTR 내 렌티바이러스 R 영역은 전체적으로 또는 부분적으로 비-렌티바이러스 레트로바이러스 유래의 R 영역으로 대체될 수 있다. 특정 실시형태에서, TAT 단백질과 상호작용하여 바이러스 복제를 향상시키는 서열인 렌티바이러스 TAR 서열은 R 영역으로부터, 바람직하게는 전체적으로 제거된다. 그 다음, TAR 서열은 비-렌티바이러스 레트로바이러스 유래의 R 영역의 비슷한 일부분으로 대체되어, 하이브리드 R 영역을 형성한다. LTR은 추가로 변형되어 렌티바이러스 U3 및 U5 영역의 전부 또는 일부분을 제거하고/하거나 비-렌티바이러스 서열로 대체할 수 있다.

[0073] 따라서, 특정 실시형태에서, SIN 구성은 TAR 서열의 전부 또는 일부분이 결여되어 있는 하이브리드 렌티바이러스 R 영역을 포함하는 레트로바이러스 LTR을 제공하여, TAT에 의한 임의의 가능한 활성화를 제거하며, 여기서 TAR 서열 또는 이의 일부분은 비-렌티바이러스 레트로바이러스 유래의 R 영역의 비슷한 일부분으로 대체되어 하이브리드 R 영역을 형성한다. 특정 실시형태에서, 레트로바이러스 LTR은 하이브리드 R 영역을 포함하며, 여기서

하이브리드 R 영역은 TAR 서열이 결여되어 있는 하이브리드 R 영역의 일부분(예를 들어, US 2003/0039636의 서열번호 10으로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 이루어진 일부분), 및 HIV R 영역이 결여된 TAR 서열과 비슷한 MoMSV R 영역의 일부분(예를 들어, 2003/0039636의 서열번호 9로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 이루어진 일부분)을 포함한다. 또 다른 특정 실시형태에서, 전체 하이브리드 R 영역은 2003/0039636의 서열번호 11로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0074] R 영역이 유래될 수 있는 적합한 렌티바이러스는, 예를 들어 HIV(HIV-1 및 HIV-2), EIV, SIV 및 FIV를 포함한다. 비-렌티바이러스 서열이 유래될 수 있는 적합한 레트로바이러스는, 예를 들어 MoMSV, MoMLV, 프렌드(Friend), MSCV, RSV 및 스푸마바이러스(Spumavirus)를 포함한다. 예시적인 일 실시형태에서, 렌티바이러스는 HIV이고, 비-렌티바이러스 레트로바이러스는 MoMSV이다.

[0075] US 2003/0039636에 기재된 또 다른 실시형태에서, 하이브리드 R 영역을 포함하는 LTR은 좌측(5') LTR이고, 하이브리드 R 영역으로부터 상류에 프로모터 서열을 추가로 포함한다. 바람직한 프로모터는 기원이 비-렌티바이러스이며, 예를 들어 비-렌티바이러스 레트로바이러스 유래의 U3 영역(예를 들어, MoMSV U3 영역)을 포함한다. 일 특정 실시형태에서, U3 영역은 US 2003/0039636의 서열번호 12로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 좌측(5') LTR은 하이브리드 R 영역으로부터 하류에 렌티바이러스 U5 영역을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, U5 영역은 게놈 통합에 필요한 HIV att 부위를 포함하는 HIV U5 영역이다. 또 다른 실시형태에서, U5 영역은 US 2003/0039636의 서열번호 13으로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 전체 좌측(5') 하이브리드 LTR은 US 2003/0039636의 서열번호 1로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0076] 또 다른 예시적인 실시형태에서, 하이브리드 R 영역을 포함하는 LTR은 우측(3') LTR이고, 하이브리드 R 영역으로부터 상류에 변형된(예를 들어, 절단된) 렌티바이러스 U3 영역을 추가로 포함한다. 변형된 렌티바이러스 U3 영역은 att 서열을 포함할 수 있지만, 프로모터 활성을 갖는 임의의 서열이 결여되어, 바이러스 전사가 염색체 통합 후 제1 복제 라운드를 넘을 수 없다는 점에서 벡터가 SIN이 되게 한다. 특정 실시형태에서, 하이브리드 R 영역으로부터 상류의 변형된 렌티바이러스 U3 영역은 최대 렌티바이러스 U3 att 부위까지 그리고 이 부위를 포함하는 렌티바이러스(예를 들어, HIV) U3 영역의 3' 말단으로 이루어진다. 일 실시형태에서, U3 영역은 US 2003/0039636의 서열번호 15로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 우측(3') LTR은 하이브리드 R 영역으로부터 하류에 폴리아데닐화 서열을 추가로 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 폴리아데닐화 서열은 US 2003/0039636의 서열번호 16으로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 전체 우측(5') LTR은 US 2003/0039636의 서열번호 2 또는 17로 나타낸 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0077] 따라서, HIV 기반 LV의 경우에, 이와 같은 벡터는 벡터 역가의 상당한 감소 없이 LTR TATA 박스의 제거(예를 들어, -418 내지 -18의 결실)를 포함하여, 상당한 U3 결실을 용인하는 것으로 밝혀졌다. 이들 결실은 LTR의 전사 능력이 약 90% 이하로 감소된다는 점에서 LTR 영역을 실질적으로 전사적 불활성이 되게 한다.

[0078] 또한, 전달 벡터 작제물에서 상류 LTR의 일부가 구성적으로 활성인 프로모터 서열로 대체되는 경우 Tat의 트랜스-작용 기능이 불필요하게 되는 것을 입증하였다(예를 들어, 문헌[Dull *et al.* (1998) *J Virol.* 72(11): 8463-8471] 참조). 또한, 본 발명자들은 트랜스로의 *rev*의 발현이 단지 *gag* 및 *pol*을 함유하는 패키징 작제물로부터 고역가의 HIV-유래 벡터 스톡의 생성을 가능하게 함을 보여준다. 이러한 설계는 상보성을 조건으로 한 패키징 기능의 발현이 생산자 세포에서만 이용 가능하게 한다. 생성된 유전자 전달 시스템은 HIV-1의 9개 유전자 중 단지 3개만 보존하며, 형질도입 입자의 생성을 위해 4개의 별개 전사 단위에 의존한다.

[0079] 실시예 1에 예시된 일 실시형태에서, 내인성 FoxP3 프로모터, 및 선택적으로 FoxP3 조절 제어 요소에 작동 가능하게 연결된 FoxP3 cDNA를 발현하는 카세트는 pCCL LV 백본에 위치하며, 이는 5' LTR에서 치환된 CMV 인핸서/프로모터를 갖는 SIN 벡터이다.

[0080] CMV 프로모터는 전형적으로 높은 수준의 비-조직 특이적 발현을 제공하는 것으로 인식될 것이다. 유사한 구성적 활성을 갖는 다른 프로모터는 RSV 프로모터, 및 SV40 프로모터를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 포유동물 프로모터, 예컨대 베타-액틴 프로모터, 유비퀴틴 C 프로모터, 신장 인자 1α프로모터, 튜불린 프로모터 등이 또한 사용될 수 있다.

[0081] 전술한 SIN 구성은 예시적이고 비제한적이다. 다수의 SIN 구성이 당업자에게 알려져 있다. 상기 나타낸 바와 같이, 특정 실시형태에서, LTR 전사는 약 95% 내지 약 99% 만큼 감소된다. 특정 실시형태에서, LTR은 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도

약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 전사적 불활성화될 수 있다.

[0082] **패키징 신호.**

[0083] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 벡터는 패키징 신호를 포함한다. "패키징 신호", "패키징 서열", 또는 "프사이(psi) 서열"은 서열이 레트로바이러스 입자로의 패키징 신호를 포함하는 핵산의 패키징을 지시하기에 충분한 임의의 핵산 서열이다. 상기 용어는 천연 발생 패키징 서열 및 또한 이의 조작된 변이체를 포함한다. 렌티바이러스를 포함하여 다수의 상이한 레트로바이러스의 패키징 신호가 당업계에 알려져 있다.

[0084] **Rev 반응 요소(RRE).**

[0085] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LV는 Rev 반응 요소(RRE)를 포함하여 스플라이싱되지 않은 RNA의 핵외 수송(nuclear export)을 향상시킨다. RRE는 당업자에게 잘 알려져 있다. 예시적인 RRE는 HIV NL4-3 게놈(젠뱅크(Genbank) 수탁 번호 AF003887)의 7622 내지 8459번 위치에 위치한 것과 같은 RRE뿐만 아니라, HIV의 다른 균주 또는 다른 레트로바이러스 유래의 RRE를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이와 같은 서열은 젠뱅크로부터 또는 URL이 hiv-web.lanl.gov/content/index인 데이터베이스로부터 용이하게 입수가능하다.

[0086] **중심 폴리퓨린관(cPPT).**

[0087] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 벡터는 중심 폴리퓨린관을 포함한다. 렌티바이러스(예를 들어, HIV-1) 벡터 작제물에 중심 폴리퓨린관(cPPT)을 함유하는 단편의 삽입은, 보고에 따르면 중심 DNA 플랩을 통한 바이러스 cDNA의 핵이동(nuclear import)을 촉진시킴으로써, 형질도입 효율을 현저하게 향상시키는 것으로 알려져 있다.

[0088] **발현-자극 전사후 조절 요소(PRE)**

[0089] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 LV는 전사체 내의 존재가 단백질 수준에서 이종성 핵산(예를 들어, 인간 *FoxP3* cDNA)의 발현을 증가시키는 임의의 다양한 전사후 조절 요소(PRE)를 포함할 수 있다. PRE는 특정 실시형태, 특히 보통의 프로모터를 갖는 렌티바이러스 작제물을 포함하는 실시형태에서 특히 유용할 수 있다.

[0090] PRE의 한 유형은 유전자 발현을 자극할 수 있는 발현 카세트 내에 위치한 인트론이다. 그러나, 인트론은 렌티바이러스의 생활 주기 사건 동안 스플라이싱으로 제거될 수 있다. 따라서, 인트론이 PRE로서 사용되는 경우, 인트론은 전형적으로 벡터 게놈 전사체와 반대 방향으로 배치된다.

[0091] 스플라이싱 사건에 의존하지 않는 전사후 조절 요소는 바이러스 생활 주기 동안 제거되지 않는 이점을 제공한다. 일부 예는 단순 포진 바이러스의 전사후 가공 요소, B형 간염 바이러스의 전사후 조절 요소(HPRE) 및 우드처크 간염 바이러스의 전사후 조절 요소(WPRE)이다. 이들 중 WPRE는 HPRE에서 발견되지 않는 추가적인 시스-작용 요소를 함유하므로, 전형적으로 바람직하다. 이러한 조절 요소는 전형적으로 벡터 내에 위치하여 이식유전자의 RNA 전사체에 포함되지만, 이식유전자 번역 단위의 정지 코돈 외부에 위치한다.

[0092] WPRE는 미국 특허 6,136,597에서 특성화되고 기재되어 있다. 여기에 기재된 바와 같이, WPRE는 핵으로부터 세포질로 RNA의 효율적인 수송을 매개하는 RNA 수송(export) 요소이다. 이는 시스-작용 핵산 서열의 삽입에 의해 이식유전자의 발현을 향상시켜, 요소 및 이식유전자가 단일 전사체 내에 함유되도록 한다. 센스(sense) 방향으로 WPRE의 존재는 이식유전자 발현을 최대 7 내지 10배만큼 증가시키는 것으로 나타났다. 인트론으로서 완전한 인트론-함유 유전자 대신 cDNA의 형태인 레트로바이러스 벡터 전달 서열은 일반적으로 레트로바이러스 입자의 형성을 초래하는 일련의 사건 동안 스플라이싱으로 제거된다. 인트론은 스플라이싱 조직을 이용하여 1차 전사체의 상호작용을 매개한다. 스플라이싱 조직에 의한 RNA의 가공은 RNA의 세포질 수송을 촉진시키기 때문에, 스플라이싱과 수송 조직 사이의 커플링으로 인해, cDNA는 종종 비효율적으로 발현된다. 따라서, 벡터에서 WPRE의 포함은 이식유전자의 발현 향상을 초래한다.

[0093] **절연체 요소**

[0094] 특정 실시형태에서, 생물안전성을 추가로 향상시키기 위해, 절연체를 본 명세서에 기재된 LV에 삽입할 수 있다. 절연체는 게놈 전체에 걸쳐 존재하는 DNA 서열 요소이다. 절연체는 염색질을 변형시키고 국소적 유전자 발현을 변경시키는 단백질에 결합한다. 본 명세서에 기재된 벡터에서 절연체의 배치는 특히 다음을 포함하는 다양한 잠재적 이점을 제공한다: 1) 측접 염색체에 의한 발현의 위치 효과 변화로부터 벡터의 차폐(즉, 장벽 활성); 및 2) 벡터에 의한 유전자 발현의 삽입 트랜스-활성화로부터 측접 염색체의 차폐(인핸서 차단). 따라서, 절연체는, 발현이 달리 게놈 또는 유전적 내용물 내의 조절 신호에 의해 영향을 받을 수 있는 게놈 또는 유전적 내용물에

내재된 유전자 또는 전사 단위의 독립적인 기능을 보존하는 것을 도울 수 있다(예를 들어, 문헌[Burgess-Beusse *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 99: 16433]; 및 [Zhan *et al.* (2001) *Hum. Genet.*, 109: 471] 참조). 본 문맥에서, 절연체는 통합 부위 효과로부터 렌티바이러스-발현 서열을 보호하는 데 기여할 수 있으며, 이는 게놈 DNA에 존재하는 시스-작용 요소에 의해 매개되고 전달된 서열의 조절되지 않은 발현을 초래할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 절연체 서열이 하나 또는 둘의 LTR 또는 세포 게놈 내로 통합되는 벡터의 영역의 어느 곳에 삽입되는 LV가 제공된다.

[0095] 최초의 가장 잘 특성화된 척추동물 염색질 절연체는 닭 β-글로빈 유전자좌 제어 영역 내에 위치한다. DN아제(DNase)-I 과민감성 부위-4(cHS4)를 함유하는 이 요소는 닭 β-글로빈 유전자좌의 5' 경계를 구성하는 것으로 보인다(Prioleau *et al.* (1999) *EMBO J.* 18: 4035-4048). cHS4 요소를 함유하는 1.2 kb 단편은 세포주에서 글로빈 유전자 프로모터 및 인핸서의 상호작용을 차단하는 능력(Chung *et al.* (1993) *Cell,* 74: 505-514), 및 초파리(*Drosophila*)(*Id.*), 형질전환된 세포주(Pikaart *et al.* (1998) *Genes Dev.* 12: 2852-2862), 및 유전자이식 포유동물(Wang *et al.* (1997) *Nat. Biotechnol.,* 15: 239-243; Taboit-Dameron *et al.* (1999) *Transgenic Res.,* 8: 223-235)에서 발현 카세트를 위치 효과로부터 보호하는 능력을 포함하여, 고전적인 절연체 활성을 나타낸다. 다수의 이러한 활성은 250 bp 단편에 함유되어 있다. 이러한 구간 내에 인핸서-차단 분석에 개입되는 징크 핑거 DNA 결합 단백질 CTCF와 상호작용하는 49 bp cHS4 코어(Chung *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA,* 94: 575-580)가 있다(Bell *et al.* (1999) *Cell,* 98: 387-396).

[0096] 하나의 예시적이고 적합한 절연체는, 문헌[Ramezani *et al.* (2008) *Stem Cell* 26: 3257-3266]에 기재된 인간 T-세포 수용체 알파/델타 차단 요소 알파/델타 I(BEAD-I) 절연체 유래의 닭 β-글로빈 5' HS4 절연체 및 상동성 영역의 최소의 CTCF 결합 부위 인핸서-차단 성분을 함유하는 77 bp 절연체 요소인 FB(FII/BEAD-A)이다. FB "합성" 절연체는 완전한 인핸서 차단 활성을 갖는다. 이러한 절연체는 예시적이고 비제한적이다. 예를 들어 전장 닭 베타-글로빈 HS4 또는 이의 절연체 서브-단편, 안키린 유전자 절연체 및 다른 합성 절연체 요소를 포함한 다른 적합한 절연체가 사용될 수 있다.

[0097] 특정 실시형태에서, U3 영역 내에 함유된 A2 절연체가 있다.

[0098] **형질도입된 숙주 세포 및 세포 형질도입 방법.**

[0099] 본 명세서에 기재된 재조합 LV 및 생성된 바이러스는 포유동물 세포로 핵산(예를 들어, 인간 FoxP3 단백질을 암호화하는 핵산) 서열을 전달할 수 있다. 세포로의 전달을 위하여, 본 발명의 벡터는 바람직하게는 적합한 패키징 세포주와 함께 사용되거나 필요한 레트로바이러스 유전자(예를 들어, gag 및 pol)를 함유하는 다른 벡터 플라스미드와 함께 시험관 내에서 세포 내로 공동 형질감염되어 본 발명의 벡터를 패키징하고 세포를 감염시킬 수 있는 복제 무능 비리온을 형성한다.

[0100] 본 명세서에 기재된 재조합 LV 및 생성된 바이러스는 포유동물 세포로 핵산 서열(예를 들어, 인간 FoxP3 단백질을 암호화하는 핵산)을 전달할 수 있다. 세포로의 전달을 위하여, 본 발명의 벡터는 전형적으로 적합한 패키징 세포주와 함께 사용되거나 필요한 레트로바이러스 유전자(예를 들어, gag 및 pol)를 함유하는 다른 벡터 플라스미드와 함께 시험관 내에서 세포 내로 공동 형질감염되어 본 발명의 벡터를 패키징하고 세포를 감염시킬 수 있는 복제 무능 비리온을 형성한다.

[0101] 전형적으로, 벡터는 형질감염을 통해 패키징 세포주 내로 도입된다. 패키징 세포주는 벡터 게놈을 함유하는 바이러스 입자를 생성한다. 형질감염 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 패키징 세포주로의 패키징 벡터 및 전달 벡터의 공동 형질감염 후, 재조합 바이러스는 배양 배지로부터 회수되고 당업자가 사용하는 표준 방법에 의해 적정된다. 따라서, 패키징 작제물은 일반적으로 우성 선별 마커, 예컨대 네오마이신, DHFR, 글루타민 합성효소와 함께 인산칼슘 형질감염, 리포펙션 또는 전기천공에 의해 인간 세포주로 도입된 다음, 적절한 약물의 존재하에 선택되고 클론이 단리될 수 있다. 특정 실시형태에서, 선별 마커 유전자는 작제물에서 패키징 유전자에 물리적으로 연결될 수 있다.

[0102] 패키징 기능이 적합한 패키징 세포에 의해 발현되도록 구성된 안정적인 세포주는 알려져 있다(예를 들어, 패키징 세포를 기재하는 미국 특허 5,686,279 참조). 일반적으로, 바이러스 입자의 생성을 위해, 렌티바이러스 Gag 및 Pol 유전자의 발현과 양립가능한 임의의 세포, 또는 이와 같은 발현을 지지하도록 조작될 수 있는 임의의 세포가 이용될 수 있다. 예를 들어, 생산자 세포, 예컨대 293T 세포 및 HT1080 세포가 사용될 수 있다.

[0103] 패키징 세포에 통합된 렌티바이러스 세포를 갖는 패키징 세포는 생산자 세포를 형성한다. 따라서 생산자 세포는 관심이 있는 치료 유전자(예를 들어, 인간 *FoxP3* 유전자 또는 cDNA)를 보유하는 패키징된 감염성 바이러스 입자

를 생성하거나 방출할 수 있는 세포 또는 세포주이다. 이러한 세포는 추가로 고정 의존성일 수 있으며, 이는 이들 세포가 표면, 예컨대 유리 또는 플라스틱에 부착될 경우 최적으로 성장, 생존, 또는 기능을 유지할 것임을 의미한다. 벡터가 복제 가능할 경우 렌티바이러스 벡터 패키징 세포주로서 사용되는 고정 의존성 세포주의 일부 예는 HeLa 또는 293 세포 및 PERC.6 세포이다.

[0104] 따라서, 특정 실시형태에서, 세포를 본 명세서에 기재된 렌티바이러스 벡터를 함유하는 비리온과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포로 유전자를 전달한 후, 세포의 게놈 내로 통합시키는 방법이 제공된다. 세포(예를 들어, 조직 또는 기관의 형태)는 생체 외에서 비리온과 접촉(예를 들어, 감염)된 후, 유전자(예를 들어, *FoxP3* 유전자 또는 cDNA)가 발현될 대상체(예를 들어, 포유동물, 동물 또는 인간)에게 전달될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 세포는 대상체에 대하여 자가 유래(즉, 대상체 유래)일 수 있거나 대상체에 대하여 비-자가 유래(즉, 동종이계 또는 이종)일 수 있다. 게다가, 본 명세서에 기재된 벡터는 분열 세포 및 비분열 세포 둘 다에 전달될 수 있기 때문에, 세포는, 예를 들어 골수 세포, 중간엽 줄기 세포(예를 들어, 지방 조직으로부터 수득됨), 및 인간 및 동물 공급원으로부터 유래된 다른 1차 세포를 포함하여 매우 다양할 수 있다. 대안적으로, 비리온은 생체 내에서 대상체에게 또는 대상체의 국소 영역(예를 들어, 골수)에 직접 투여될 수 있다.

[0105] 물론, 상기 언급한 바와 같이, 본 명세서에 기재된 렌티바이러스는 골수, 말초 혈액 또는 제대혈로부터 수득된 인간 조혈 전구 세포 또는 조혈모세포의 형질도입뿐만 아니라, $CD4^+$ T 세포, 말초 혈액 B 또는 T 림프구 세포 등의 형질도입에 특히 유용할 것이다. 특정 실시형태에서, 특히 바람직한 표적은 $CD34^+$ 세포이다. 특정 실시형태에서, 특히 바람직한 표적은 $CD34^+/CD38^-$ 세포이다.

[0106] **유전자 요법.**

[0107] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 조혈모세포를 포함하는 인간 세포 집단에서 벡터에 의한 인간 조혈 전구 세포의 형질도입을 이행하는 조건 하에서 상기 집단을 전술한 렌티벡터 중 하나와 접촉시키는 단계를 포함하는, 인간 조혈모세포를 형질도입하는 방법에 관한 것이다. 줄기 세포는 최종 적용에 따라 생체 내 또는 시험관 내에서 형질도입될 수 있다. 인간 유전자 요법, 예컨대 인간 줄기 세포의 유전자 요법의 맥락에서 조차, 줄기 세포를 생체 내에서 형질도입하거나, 대안적으로 시험관 내에서 형질도입한 다음, 형질도입된 줄기 세포를 인간 대상체에게 주입할 수 있다. 이러한 실시형태의 일 양태에서, 인간 줄기 세포는 인간, 예를 들어 인간 환자로부터, 당업자에게 잘 알려진 방법을 사용하여 제거되고 상기 언급한 바와 같이 형질도입될 수 있다. 그 후 형질도입된 줄기 세포는 동일 또는 상이한 인간으로 재도입된다.

[0108] **줄기 세포/전구 세포 유전자 요법.**

[0109] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 렌티벡터는 골수, 말초 혈액 또는 제대혈로부터 수득된 인간 조혈 전구 세포 또는 조혈모세포(HSC)의 형질도입뿐만 아니라, $CD4^+$ T 세포, 말초 혈액 B 또는 T 림프구 세포 등의 형질도입에 특히 유용하다. 특정 실시형태에서, 특히 바람직한 표적은 $CD34^+$ 세포이다. 특정 실시형태에서, 바람직한 표적은 $CD34^+/CD38^-$ 세포이다.

[0110] 특정 실시형태에서, 세포, 예를 들어 $CD34^+$ 세포, 수지상 세포, 말초 혈액 세포 또는 종양 세포가 생체 외에서 형질도입되는 경우, 바이러스 입자는 일반적으로 대략 1 내지 50의 감염다중도(MOI)(이는 또한 10^5개의 세포 당 1×10^5 내지 50×10^5개의 형질도입 단위에 상응함)의 용량을 사용하여 세포와 인큐베이션된다. 이는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 및 50 MOI에 상응하는 벡터의 양을 포함할 수 있다. 전형적으로, 벡터의 양은 HT-29 형질도입 단위(TU)에 관하여 표현될 수 있다.

[0111] 특정 실시형태에서, 세포-기반 요법은 줄기 세포 및/또는 조혈 전구체를 제공하는 것을 포함하고, FoxP3 단백질을 발현하는 핵산을 암호화하는 렌티바이러스를 이용하여 세포를 형질도입시킨 후, 형질도입된 세포를 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, FoxP3 결핍 및/또는 돌연변이가 있는 대상체, 예를 들어 자가면역 장애가 있는 대상체)에 도입한다.

[0112] 특정 실시형태에서, 방법은 세포의 집단, 예를 들어 줄기 세포를 대상체로부터 단리하는 단계를 포함하고, 선택적으로 조직 배양으로 세포를 확장시키며, 세포 내의 존재가 FoxP3의 시험관 내 생성을 초래하는 렌티바이러스 벡터를 투여한다. 그 후 세포를 대상체로 되돌리고, 여기서 예를 들어 FoxP3을 생성하고 이에 의해 FoxP3 결핍 및/또는 돌연변이를 보정하는 백혈구의 집단을 제공할 수 있다. 특정 실시형태에서, 내인성 프로모터의 존재의

관점에서, 그리고 특정 실시형태에서, 내인성 인핸서(예를 들어, FoxP3 보전된 비-코딩 서열 1(FoxP3-CNS1), 및/또는 FoxP3 보존된 비-코딩 서열 2(FoxP3- CNS2), 및/또는 FoxP3 보존된 비-코딩 서열 3(FoxP3-CNS3))의 관점에서, FoxP3 발현은 FoxP3의 정상적인 생리적 발현을 반복한다.

[0113] 일부 실시형태에서, 세포주 또는 대상체 이외의 개체 유래의 세포일 수 있는 세포의 집단이 사용될 수 있다. 대상체로부터 줄기 세포, 면역계 세포 등을 단리하고 이들 세포를 대상체로 복귀시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 이러한 방법은, 화학요법을 받는 환자에서, 예를 들어 골수 이식, 말초 혈액 줄기 세포 이식 등에 사용될 수 있다.

[0114] 줄기 세포가 사용되는 경우, 이와 같은 세포는 골수(BM), 제대혈(CB), 동원된 말초 혈액 줄기 세포(mPBSC) 등을 포함하는 다수의 공급원으로부터 유래될 수 있음이 인식될 것이다. 특정 실시형태에서, 유도된 다능성 줄기 세포(IPSC)의 사용이 고려된다. 조혈모세포(HSC)를 단리하고, 이와 같은 세포를 형질도입한 다음, 이들 세포를 포유동물 대상체로 도입하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0115] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 렌티바이러스 벡터(예를 들어, 도 6 및 7, 서열번호 1 참조)는, FoxP3 단백질을 암호화하는 핵산을, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 자가면역 질환이 있는 환자의 골수 줄기 세포로 도입한 다음, 자가 이식함으로써, 줄기 세포 유전자 요법에서 부족하거나 결함이 있는 FoxP3 발현을 특징으로 하는 병태에 사용된다.

[0116] **벡터의 직접 도입.**

[0117] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 벡터(들)의 직접 도입에 의한 대상체의 직접 치료가 고려된다. 렌티바이러스 조성물은 비경구(예를 들어, 정맥내), 피내, 피하, 경구(예를 들어, 흡입), 경피(국부), 경점막, 직장, 및 질을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아닌 임의의 이용 가능한 경로에 의한 전달을 위해 제형화될 수 있다. 일반적으로 사용되는 전달 경로는 흡입, 비경구, 및 경점막을 포함한다.

[0118] 다양한 실시형태에서, 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체와 조합하여 LV를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 약학 투여와 양립가능한 용매, 분산 매질, 코팅재, 항균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 보충적인 활성 화합물이 또한 조성물에 혼입될 수 있다.

[0119] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 활성제, 즉 렌티바이러스 벡터, 바이러스 입자 등 및/또는 벡터와 함께 투여되는 다른 작용제는 화합물이 신체로부터 빨리 제거되는 것을 방지할 담체와 함께, 예컨대 임플란트 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함한 방출 제어 제형으로 제조된다. 생분해성이고 생체적합성인 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오쏘에스터, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이와 같은 조성물의 제조 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 적합한 물질은 또한 알자 코포레이션(Alza Corporation) 및 노바 파마슈티칼스사(Nova Pharmaceuticals, Inc)로부터 상업적으로 입수될 수 있다. 리포좀은 또한 약학적으로 허용가능한 담체로서 사용될 수 있다. 이는, 예를 들어 미국 특허 4,522,811에 기재된 바와 같이, 당업자에게 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 바이러스에 의해 감염된 세포 또는 특정 세포 유형을 표적으로 한다. 예를 들어, 조성물은 세포 표면 마커, 예를 들어 감염된 세포의 표면 상에서 발현된 내인성 마커 또는 바이러스 항원에 대한 단클론성 항체를 사용하여 표적화될 수 있다.

[0120] 투여 용이성 및 투약 균일성을 위해 조성물을 투약 단위 형태로 제형화하는 것이 유리하다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 투약 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 단일 투약량으로 적합한 물리적으로 별개인 단위를 말하고; 각각의 단위는 약학 담체와 함께 원하는 치료 효과를 생성하는 것으로 계산된 소정량의 LV를 포함한다.

[0121] 단위 용량은 단일 주사로 투여될 필요는 없지만, 설정된 시간에 걸친 연속 주입을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 LV의 단위 용량은 세포주, 예컨대 HeLa 또는 293 상에서 벡터를 적정함으로써 정의된 바와 같이, 렌티벡터의 형질도입 단위(T.U.)의 관점에서 편리하게 기재될 수 있다. 특정 실시형태에서, 단위 용량은 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13} T.U. 이상의 범위일 수 있다.

[0122] 약학 조성물은 필요에 따라 다양한 간격으로 및 상이한 시간에 걸쳐, 예를 들어 약 1 내지 약 10주; 약 2 내지 약 8주; 약 3 내지 약 7주; 약 4주; 약 5주; 약 6주 등의 기간 동안 주당 1회로 투여될 수 있다. 치료 조성물을 무기한으로 투여하는 것이 필요할 수 있다. 당업자는 질환 또는 장애의 중증도, 이전 치료, 대상체의 전반적인 건강 및/또는 연령, 및 다른 존재하는 질환을 포함하지만 이에 제한되지는 않는 특정 인자가 대상체를 효과적으로 치료하는 데 요구되는 투약량 및 시기에 영향을 줄 수 있음을 이해할 것이다. LV를 이용한 대상체의 치료는

단일 치료를 포함할 수 있거나, 다수의 경우에 일련의 치료를 포함할 수 있다.

[0123] 유전자 요법 벡터의 투여를 위한 예시적인 용량 및 적합한 용량을 결정하는 방법은 당업계에 알려져 있다. LV의 적절한 용량은 특정 수용자 및 투여 방식에 따라 달라질 수 있음이 추가로 이해된다. 임의의 특정 대상체에 대한 적절한 용량 수준은 대상체의 연령, 체중, 전반적인 건강, 성별, 및 식이, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도, 다른 투여되는 치료제 등을 포함한 다양한 인자에 따라 달라질 수 있다.

[0124] 특정 실시형태에서, 렌티바이러스 유전자 요법 벡터는, 예를 들어 정맥내 주사, 국소 투여에 의해, 또는 정위 주사에 의해 대상체에게 전달될 수 있다(예를 들어, 문헌[Chen *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 91: 3054] 참조). 특정 실시형태에서, 벡터는 경구로 또는 흡입으로 전달될 수 있고, 캡슐화되거나 다르게 조작되어 벡터를 분해로부터 보호하거나 조직 또는 세포로의 흡수 등을 향상시킬 수 있다. 약학 제제는 허용가능한 희석제 중에 LV를 포함할 수 있거나, LV가 내장된 서방형 매트릭스를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 본 명세서에 기재된 바와 같은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터의 경우와 같이 벡터가 재조합 세포로부터 온전히 생성될 수 있는 경우, 약학 제제는 벡터를 생성하는 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 LV를 포함하는 약학 조성물은 선택적으로 투여 지침서와 함께, 용기, 팩, 또는 디스펜서 내에 포함될 수 있다.

[0125] 전술한 조성물, 방법 및 용도는 예시적인 것이며 제한적인 것이 아닌 것으로 의도된다. 본 명세서에 제공된 교시내용을 사용하여 조성물, 방법 및 용도에 대하여 다른 변형이 당업자에게 용이하게 이용 가능할 것이다.

[0126] **실시예**

[0127] 하기 실시예는 청구된 발명을 예시하기 위하여 제공되며, 이를 제한하기 위한 것이 아니다.

[0128] **실시예 1**

[0129] **pCCL-CNSp-FOXP3-3UTR-A2 벡터의 평가**

[0130] 도 6 및 7은 내인성 FoxP3 프로모터 및 인핸서(CNS1, CNS2, 및 CNS3)의 제어 하에서 FoxP3을 암호화하는 렌티바이러스 벡터의 구조를 예시한다. 구체적으로, 도 6은 pCCL-CNSp-FOXP3-3UTR-A2 벡터(또한 하기 표 1에 나타낸 서열번호 1(접합 마커로부터의 서열))의 구조를 예시한다. 인간 게놈 기원의 서열은 다음을 포함한다: 문헌[Tone *et al.* (2008) *Nat. Immunol.* 9: 194-202]에 기재된 서열을 기반으로 하지만 이와 동일하지는 않은 최소 서열인 CNS1(237 bp), 문헌[Kim and Leonard (2007) *J. Exp. Med.* 204: 1543-1551]에 기재된 CNS2(359 bp), 문헌[Zheng *et al.*(2010) *Nature,* 473: 808-813]에 기재된 CNS3(217 bp), 상기 문헌[Kim and Leonard (2007)]에 기재된 서열에서 변형된 FoxP3 프로모터(382 bp), 인간 게놈 NCBI 기준 서열 파일 NM_014009에 기반한 5'UTR(187 bp); 인간 게놈 NCBI 기준 서열 파일 NM_014009에 기반한 FoxP3 cDNA(1292 bp); 인간 게놈 NCBI 기준 서열 파일 NM_014009에 기반한 3'UTR(875 bp).

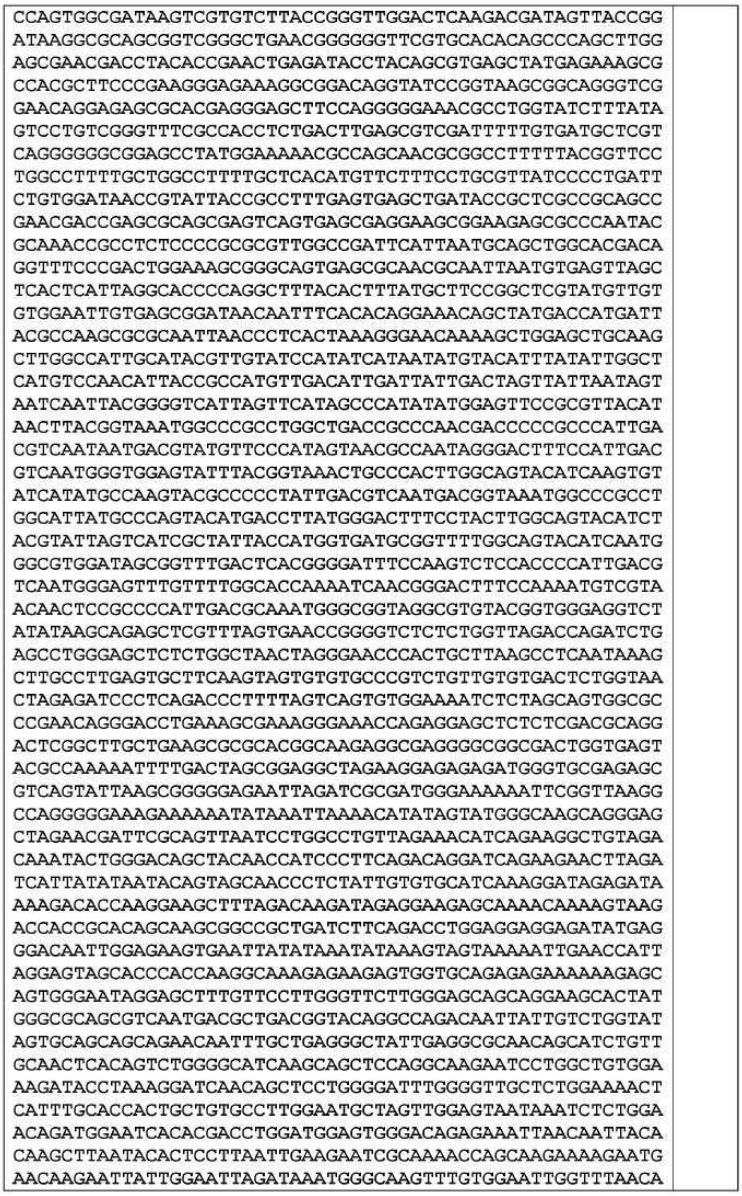
표 1

Foxp3 발현 벡터 뉴클레오타이드 서열. 접합 마커로부터 나타낸 서열.

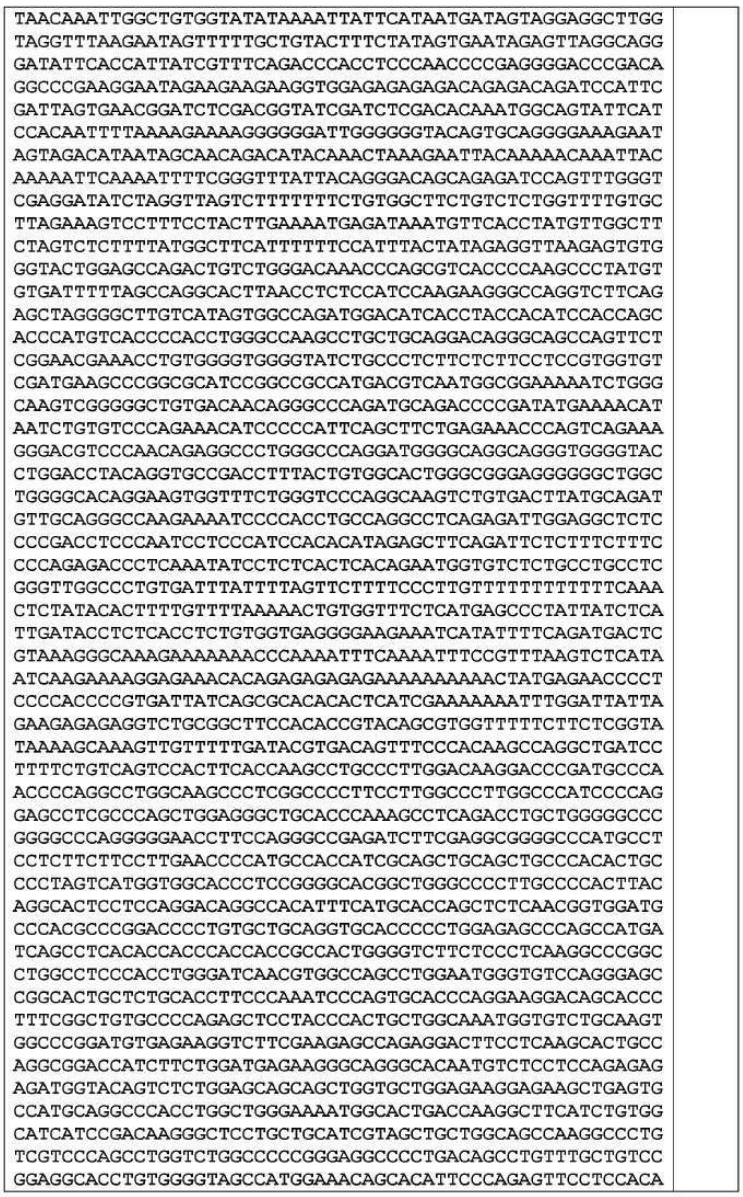
서열	서열 번호
접합 마커로부터의 서열: CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCT AAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTC AATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTA TTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGG TGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAC TGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTC CAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTG ACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGG TTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG AATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTC TGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGG ATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAA ACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC TATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGA TGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCT GGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTG CAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGG GGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCT CACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGA TTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTG ATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAG ACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAA TCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGG ATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGA TACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACT CTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTG	1

[0131]

[0132]


CCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGG
ATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGG
AGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCG
CCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCG
GAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATA
GTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGT
CAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCC
TGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATT
CTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCC
GAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATAC
GCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACA
GGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGC
TCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGT
GTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATT
ACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTGCAAG
CTTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCT
CATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGT
AATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACAT
AACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGA
CGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGAC
GTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT
ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCT
GGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCT
ACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATG
GGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACG
TCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTA
ACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCT
ATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTG
AGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAG
CTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAA
CTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGC
CCGAACAGGGACCTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGG
ACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGT
ACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGC
GTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGG
CCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAG
CTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGA
CAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGA
TCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATA
AAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAG
ACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAG
GGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATT
AGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGC
AGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTAT
GGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTAT
AGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTT
GCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGA
AAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACT
CATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGA
ACAGATGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACA
CAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATG
AACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACA

[0133]



TAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGG
TAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGG
GATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACA
GGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTC
GATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGATCTCGACACAAATGGCAGTATTCAT
CCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAAT
AGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTAC
AAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGGT
CGAGGATATCTAGGTTAGTCTTTTTTTTCTGTGGCTTCTGTCTCTGGTTTTGTGC
TTAGAAAGTCCTTTCCTACTTGAAAATGAGATAAATGTTCACCTATGTTGGCTT
CTAGTCTCTTTTATGGCTTCATTTTTTCCATTTACTATAGAGGTTAAGAGTGTG
GGTACTGGAGCCAGACTGTCTGGGACAAACCCAGCGTCACCCCAAGCCCTATGT
GTGATTTTTAGCCAGGCACTTAACCTCTCCATCCAAGAAGGGCCAGGTCTTCAG
AGCTAGGGGCTTGTCATAGTGGCCAGATGGACATCACCTACCACATCCACCAGC
ACCCATGTCACCCCACCTGGGCCAAGCCTGCTGCAGGACAGGGCAGCCAGTTCT
CGGAACGAAACCTGTGGGGTGGGGTATCTGCCCTCTTCTCTTCCTCCGTGGTGT
CGATGAAGCCCGGCGCATCCGGCCGCCATGACGTCAATGGCGGAAAAATCTGGG
CAAGTCGGGGGCTGTGACAACAGGGCCCAGATGCAGACCCCGATATGAAAACAT
AATCTGTGTCCCAGAAACATCCCCCATTCAGCTTCTGAGAAACCCAGTCAGAAA
GGGACGTCCCAACAGAGGCCCTGGGCCCAGGATGGGGCAGGCAGGGTGGGGTAC
CTGGACCTACAGGTGCCGACCTTTACTGTGGCACTGGGCGGGAGGGGGGCTGGC
TGGGGCACAGGAAGTGGTTTCTGGGTCCCAGGCAAGTCTGTGACTTATGCAGAT
GTTGCAGGGCCAAGAAAATCCCCACCTGCCAGGCCTCAGAGATTGGAGGCTCTC
CCCGACCTCCCAATCCTCCCATCCACACATAGAGCTTCAGATTCTCTTTCTTTC
CCCAGAGACCCTCAAATATCCTCTCACTCACAGAATGGTGTCTCTGCCTGCCTC
GGGTTGGCCCTGTGATTTATTTTAGTTCTTTTCCCTTGTTTTTTTTTTTTCAAA
CTCTATACACTTTTGTTTTAAAAACTGTGGTTTCTCATGAGCCCTATTATCTCA
TTGATACCTCTCACCTCTGTGGTGAGGGGAAGAAATCATATTTTCAGATGACTC
GTAAAGGGCAAAGAAAAAAACCCAAAATTTCAAAATTTCCGTTTAAGTCTCATA
ATCAAGAAAAGGAGAAACACAGAGAGAGAGAAAAAAAAAACTATGAGAACCCCT
CCCCACCCCGTGATTATCAGCGCACACACTCATCGAAAAAAATTTGGATTATTA
GAAGAGAGAGGTCTGCGGCTTCCACACCGTACAGCGTGGTTTTTCTTCTCGGTA
TAAAAGCAAAGTTGTTTTTGATACGTGACAGTTTCCCACAAGCCAGGCTGATCC
TTTTCTGTCAGTCCACTTCACCAAGCCTGCCCTTGGACAAGGACCCGATGCCCA
ACCCCAGGCCTGGCAAGCCCTCGGCCCCTTCCTTGGCCCTTGGCCCATCCCCAG
GAGCCTCGCCCAGCTGGAGGGCTGCACCCAAAGCCTCAGACCTGCTGGGGGCCC
GGGGCCCAGGGGGAACCTTCCAGGGCCGAGATCTTCGAGGCGGGGCCCATGCCT
CCTCTTCTTCCTTGAACCCCATGCCACCATCGCAGCTGCAGCTGCCCACACTGC
CCCTAGTCATGGTGGCACCCTCCGGGGCACGGCTGGGCCCCTTGCCCCACTTAC
AGGCACTCCTCCAGGACAGGCCACATTTCATGCACCAGCTCTCAACGGTGGATG
CCCACGCCCGGACCCCTGTGCTGCAGGTGCACCCCCTGGAGAGCCCAGCCATGA
TCAGCCTCACACCACCCACCACCGCCACTGGGGTCTTCTCCCTCAAGGCCCGGC
CTGGCCTCCCACCTGGGATCAACGTGGCCAGCCTGGAATGGGTGTCCAGGGAGC
CGGCACTGCTCTGCACCTTCCCAAATCCCAGTGCACCCAGGAAGGACAGCACCC
TTTCGGCTGTGCCCCAGAGCTCCTACCCACTGCTGGCAAATGGTGTCTGCAAGT
GGCCCGGATGTGAGAAGGTCTTCGAAGAGCCAGAGGACTTCCTCAAGCACTGCC
AGGCGGACCATCTTCTGGATGAGAAGGGCAGGGCACAATGTCTCCTCCAGAGAG
AGATGGTACAGTCTCTGGAGCAGCAGCTGGTGCTGGAGAAGGAGAAGCTGAGTG
CCATGCAGGCCCACCTGGCTGGGAAAATGGCACTGACCAAGGCTTCATCTGTGG
CATCATCCGACAAGGGCTCCTGCTGCATCGTAGCTGCTGGCAGCCAAGGCCCTG
TCGTCCCAGCCTGGTCTGGCCCCCGGGAGGCCCCTGACAGCCTGTTTGCTGTCC
GGAGGCACCTGTGGGGTAGCCATGGAAACAGCACATTCCCAGAGTTCCTCCACA

ACATGGACTACTTCAAGTTCCACAACATGCGACCCCCTTTCACCTACGCCACGC TCATCCGCTGGGCCATCCTGGAGGCTCCAGAGAAGCAGCGGACACTCAATGAGA TCTACCACTGGTTCACACGCATGTTTGCCTTCTTCAGAAACCATCCTGCCACCT GGAAGAACGCCATCCGCCACAACCTGAGTCTGCACAAGTGCTTTGTGCGGGTGG AGAGCGAGAAGGGGGCTGTGTGGACCGTGGATGAGCTGGAGTTCCGCAAGAAAC GGAGCCAGAGGCCCAGCAGGTGTTCCAACCCTACACCTGGCCCCTGATGACCTC AAGATCAAGGAAAGGAGGATGGACGAACAGGGGCCAAACTGGTGGGAGGCAGAG GTGGTGGGGGCAGGGATGATAGGCCCTGGATGTGCCCACAGGGACCAAGAAGTG AGGTTTCCACTGTCTTGCCTGCCAGGGCCCCTGTTCCCCCGCTGGCAGCCACCC CCTCCCCCATCATATCCTTTGCCCCAAGGCTGCTCAGAGGGGCCCCGGTCCTGG CCCCAGCCCCCACCTCCGCCCCAGACACACCCCCCAGTCGAGCCCTGCAGCCAA ACAGAGCCTTCACAACCAGCCACACAGAGCCTGCCTCAGCTGCTCGCACAGATT ACTTCAGGGCTGGAAAAGTCACACAGACACACAAAATGTCACAATCCTGTCCCT CACTCAACACAAACCCCAAAACACAGAGAGCCTGCCTCAGTACACTCAAACAAC CTCAAAGCTGCATCATCACACAATCACACACAAGCACAGCCCTGACAACCCACA CACCCCAAGGCACGCACCCACAGCCAGCCTCAGGGCCCACAGGGGCACTGTCAA CACAGGGGTGTGCCCAGAGGCCTACACAGAAGCAGCGTCAGTACCCTCAGGATC TGAGGTCCCAACACGTGCTCGCTCACACACACGGCCTGTTAGAATTCACCTGTG TATCTCACGCATATGCACACGCACAGCCCCCCAGTGGGTCTCTTGAGTCCCGTG CAGACACACACAGCCACACACACTGCCTTGCCAAAAATACCCCGTGTCTCCCCT GCCACTCACCTCACTCCCATTCCCTGAGCCCTGATCCATGCCTCAGCTTAGACT GCAGAGGAACTACTCATTTATTTGGGATCCAAGGCCCCCAACCCACAGTACCGT CCCCGAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAG ATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCC AACGAAGACAAGATCAGAGCGAGATTCCGTCTCAAAGAAAAAAAAAAGTAATGAA ATGAATAAAATGAGTCCTAGAGCCAGTAAATGTCGTAAATGTCTCAGCTAGTCA GGTAGTAAAAGGTCTCAACTAGGCAGTGGCAGAGCAGGATTCAAATTCAGGGCT GTTGTGATGCCTCCGCAGACTCTGAGCGCCACCTGGTGGTAATTTGTCTGTGCC TCTTCTGACGTGGAAGAACAGCAACTAACACACTAACACGGCATTTACTATGGG CCAGCCATTGTTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTG AGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAG CTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAA CTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAG TTCATGTCATCTTATTATTCAGTATTTATAACTTGCAAAGAAATGAATATCAGA GAGTGAGAGGAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAG CATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG TCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCCTAA CTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATG GCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGC TATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCGTCGAGA CGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGT TTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGC AGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCG CCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCGACGCGCCCTGTAG CGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACT TGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCAC GTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCG ATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTC ACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTC CACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTAT CTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTT AAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAAC	

[0134]

GTTTACAATTTCC
인간 게놈 기원의 서열: 문헌[Tone *et al.* (2008) *Nat. Immunol.* 9: 194-202]을 기반으로 하는(그러나 상기 문헌과 동일하지 않은) 최소 서열인 CNS1(237 bp) 문헌[Kim & Leonard (2007) *J. Exp. Med.* 204: 1543-1551]에서 공개된 CNS2(359 bp) 문헌[Zheng *et al.* (2010) *Nature*, 463(7282): 808-812]에서 공개된 CNS3(217 bp) 문헌[Kim & Leonard (2007) *J. Exp. Med.* 204: 1543-1551]에서 변형된 서열인 프로모터(382 bp) 인간 게놈 NCBI 기준 서열 파일 NM_014009 에 기반한 FoxP3 cDNA(1292 bp) 인간 게놈 NCBI 기준 서열 파일 NM_014009 에 기반한 3'UTR(875 bp)

[0135]

[0136] 도 1에 나타낸 바와 같이, FoxP3 리포터 벡터는 상기 기재된 작제물에 기반하여 인간 세포주에서 TReg 계통 특이적 발현을 나타냄을 보인다. 구체적으로, 패널 A는 3가지 상이한 세포주, 즉 MT-2(T-reg 유사), 주르카트(T-세포), 및 K562(적혈구)에서 내인성 FoxP3 단백질 발현의 유세포분석 측정 결과를 나타낸다. 패널 B는 FoxP3-m스트로베리 리포터 벡터를 이용하여 형질도입된 MT-2, 주르카트, 또는 K562 세포에서 m스트로베리 리포터 단백질의 발현을 나타낸다. Y-축은 m스트로베리 발현에 대해 양성인 세포의 백분율을 나타내는 한편, x-축은 세포당 벡터 복제물의 수를 나타낸다.

[0137] 도 2는 FoxP3 리포터 벡터가 뮤린 유사유전자형 이식 모델에서 TReg 계통 특이적 발현을 나타냄을 보인다.

CD45.2 FoxP3-GFP 유전자이식 마우스(FoxP3 및 GFP를 공동발현함)를 골수 공여자로서 사용하였다. lin- 세포를 CD45.2 FoxP3-GFP 마우스로부터 단리하고 FoxP3-m스트로베리 리포터 벡터를 이용하여 형질도입하였다. 형질도입된 lin- 세포를 치사량으로 조사된 유사유전자형 CD45.1 수용자에게 이식하였다. CD45.2 공여자 세포를 Treg 계통(FoxP3-GFP로 표시)에서 m스트로베리 리포터 벡터 발현에 대해 이식 후 10주째에 분석하였다. 패널 B에 나타낸 바와 같이, m스트로베리 리포터 발현을 이식받은 마우스의 골수, 비장, 및 흉선에서의 FoxP3-(GFP-) 및 FoxP3+(GFP+) 공여자 세포에서 측정하였다. Y 축은 각각의 집단에서 m스트로베리+ 세포의 백분율을 나타낸다.

[0138] 도 3은 FoxP3 리포터 벡터가 인간화 마우스 모델에서 Treg 계통 특이적 발현을 나타냄을 보인다. 인간 제대혈로부터 단리한 CD34+ 세포를 FoxP3m스트로베리 리포터 벡터를 이용하여 형질도입하고 신생아 면역-결핍 NSG 마우스에게 이식하였다. 이식 후 12주째에, 생착된 hCD45+ 세포를 m스트로베리 발현에 대해 분석하였다. 패널 B에 나타낸 바와 같이, 생착된 hCD45+ 세포에서 계통 특이적 m스트로베리 발현. NSG 골수(CD19+ B 세포, CD33+ 골수 세포, CD34+ 줄기 세포 및 전구 세포, 및 CD3+ T 세포), 흉선(CD4-CD8- 이중 음성[DN], CD4+CD8+ 이중 양성[DP], CD4CD8+ 단일 양성[CD8 SP], CD4+CD8-CD25-[CD4 Tconv 세포], 및 CD4+CD8-CD25+[Treg]), 및 비장(CD8 T 세포, CD4+CD25- Tconv 세포, 및 CD4+CD25+ Treg 세포)에서 계통 마커에 의해 hCD45+ 세포를 게이팅하였다. 히스토그램은 각각의 계통 내에서 m스트로베리 발현을 나타낸다. 점선은 "m스트로베리 높음"에 대한 컷오프를 나타낸다. 패널은 각각의 hCD45+ 계통에서 m스트로베리가 높은 세포의 백분율을 나타낸다. 데이터는 상이한 제대혈 CD34+ 공여자를 사용한 2가지의 독립적인 실험을 나타낸다. 패널 D는 인간화 마우스에서 FoxP3 및 m스트로베리의 공동발현을 나타낸다. 이식받은 NSGSGM3 마우스 유래의 인간 CD4+ 세포를 m스트로베리 발현에 기초하여 분류한 다음, FoxP3 발현에 대하여 세포내 염색 및 유세포분석을 수행하였다. 좌측 패널은 m스트로베리 발현에 의한 인간 CD4+ 세포의 분류를 나타내는 한편, 우측 패널은 각각의 분류된 집단 내에서 FoxP3 발현을 나타낸다.

[0139] 도 4는 FoxP3-결핍 뮤린 HSC로의 계통 특이적 FoxP3 코딩 벡터의 도입이 기능적 Treg 발생을 회복한다는 것을 보인다. 패널 A는 실험 설정을 나타낸다. lin- 세포를 FoxP3 결핍(스컬피) 공여자 마우스로부터 단리하고 FoxP3 cDNA 및 리포터 m스트로베리를 둘 다 발현하는 FoxP3 코딩 벡터를 이용하여 형질도입하였다. 형질도입된 lin- 세포를 치사량으로 조사된 WT CD45.1 유사유전자형 수용자에게 이식하였다. 12주 후, m스트로베리+ 세포("보정한 Tregs")를 Treg 억제 능력(패널 B) 및 Treg 표면 마커 발현(패널 C)에 대하여 평가하였다. 각각의 실험에 있어서, 스컬피 마우스 유래의 보정한 Treg를 WT FoxP3-GFP 마우스 유래의 천연 GFP+ Treg와 비교하였다. 패널 B에 나타낸 바와 같이, 분류된 Treg(nTreg = 천연 GFP+ Treg 또는 cTreg = 보정한 m스트로베리 Treg)를 비드-결합된 CD3/CD28 항체의 존재 하에서 세포 추적 바이올렛으로 표지된 CD4+FoxP3- 반응자 세포와 공동 배양하였다. Treg를 Tresp 세포와 1:1의 비율로 배양하였다. 배양 4일 후, 각각의 그룹에서 표지된 반응자 세포의 분열 지수를 계산함으로써 Treg 억제를 결정하였다. 데이터는 1 내지 2개의 복제 웰로부터의 평균 +/- SEM을 나타낸다. 패널 C) WT FoxP3-GFP 마우스(상부) 또는 생착된 CD45.2 보정한 공여자 스컬피 세포(하부) 유래의 흉선세포. 우측 패널은 각각의 게이팅된 CD4 SP 흉선세포 집단(GFP-, GFP+, m스트로베리스-, 또는 m스트로베리+)에서 Treg 표면 마커(CD25, GITR, 및 CTLA4)의 발현을 나타낸다.

[0140] 도 5의 패널 A 내지 E는 계통 특이적 FoxP3 cDNA 벡터가 스컬피 마우스(FoxP3-결핍 마우스 모델)를 구제할 수 있는 기능적인 Treg를 생성한다는 것을 보인다. 패널 A) 실험 설정: 스컬피 또는 WT HSPC(CD45.2)를 FoxP3 리포터 벡터 또는 FoxP3 cDNA 벡터를 이용하여 형질도입하고 치사량으로 조사된 유사유전자형(CD45.1) 수용자에게 이식하였다. 이식 후 12주째에, 공여자 CD45.2+CD4+ 세포(추정 Treg를 함유함)를 이식 수용자의 비장으로부터 정제하고, 스컬피 신생아에게 간내 주사하였다. CD4 T 세포의 전달 후 21일째에 스컬피 신생아의 구제를 평가하였다. 패널 B) 21일째에 구제된 스컬피 신생아 유래의 비장 CD4 세포: 좌측 플롯은 Sf-Treg(보정하지 않음)를 받은 스컬피 마우스를 나타내는 한편, 우측 플롯은 cSf-Treg(보정함)를 받은 스컬피 마우스를 나타낸다. Y-축은 인간 FoxP3 발현(FoxP3 LV에 의해 암호화됨)을 나타내는 한편, x-축은 뮤린 FoxP3 발현(스컬피 마우스 둘 다에 부재)을 나타낸다. 패널 C) 구제된 스컬피 마우스 또는 WT 한배새끼 대조군에 있어서 비장 대 체중 비율. 패널 D) 21일째에 구제된 스컬피 신생아에서 비장 CD4 T 세포의 표현형. 적색 박스는 CD44+CD62L-(활성화) CD4 T 세포를 강조표시하는 한편, 청색 박스는 CD44-CD62L+(미경험) CD4 T 세포를 강조표시한다. 패널 E) 21일째에 구제된 스컬피 신생아의 사진. 백색 화살표는 귀의 기형 보정을 강조표시한다.

[0141] **실시예 2**

[0142] **IPEX 증후군에 대한 조혈모세포 유전자 요법**

[0143] 면역 조절이상, 다발성 내분비병증, 장병증, X-연관(IPEX) 증후군은, 조절 T 세포(Treg)의 발달 및 기능에 필요한 계통-결정 전사 인자인 FOXP3에서의 돌연변이에 의해 야기되는 대단히 파괴적인 자가면역 질환이다. Treg는

자가반응성 T 세포 반응을 억제하는 데 중요하므로, IPEX 환자에서 Treg의 기능장애는 심각한 자가면역을 유발한다. 동종이계 조혈모세포(HSC) 이식은 치료가 가능하지만, 적합한 공여자가 종종 이용 가능하지 않을 수 있다. 여기서, 본 발명자는 렌티바이러스 벡터(LV)를 이용하여 내인성 조절 요소의 제어 하에 발달상 적절한 FoxP3 발현을 회복하는 자가 HSC 이식 및 유전자 요법에 대한 전략을 입증한다. 뮤린 유사유전자형 이식 모델 및 LV-변형 HSC로 이식받은 인간화 마우스 둘 다 CD4+CD25+FoxP3+ Treg로 제한된 높은 수준의 LV 발현을 나타낸다. 스컬피(FoxP3null) HSC의 LV 형질도입은 시험관 내에서 T 세포 증식을 억제하고 생체 내에서 스컬피 자가면역 표현형을 구제하는 기능적 FoxP3+ Treg의 발달을 회복시킨다. 이러한 발견은 자가 HSC 이식에 의한 IPEX 환자의 치료를 위한 기반을 닦는 것이며, 상이한 기원의 자가면역 장애를 가진 환자에 대한 새로운 치료법으로의 귀중한 통찰력을 제공할 수 있다.

[0144] 보다 구체적으로, 여기서, 본 발명자들은 생리적 FoxP3 발현을 반복하는 인간 FOXP3 유전자 요소에 의해 조절되는 LV의 발달을 기재한다. 뮤린 및 인간 HSPC로의 이러한 벡터의 도입은 Treg-제한 발현을 초래하고 FoxP3-결핍 HSPC로부터 기능적 Treg 발달을 회복시킨다. 본 발명자들은 이러한 전략이 스컬피 마우스(IPEX의 FoxP3null 마우스 모델)의 자가면역 표현형을 치료할 수 있는, 억제 FoxP3+ Treg를 생성한다. 추가적으로, 건강한 공여자 유래의 LV-변형된 인간 HSPC를 이용하여 이식받은 인간화 마우스 모델은 높은 수준의 Treg-특이적 LV 발현을 나타내며, 이는 이러한 접근법이 인간 IPEX 환자에서 유사하게 효과적일 수 있음을 시사한다.

[0145] **결과**

[0146] **구성적으로 활성화된 프로모터 유래의 이소성 FoxP3 발현은 HSPC 기능을 손상시킨다**

[0147] 현재까지 많은 성공적인 LV-기반 유전자 요법은 치료적 단백질의 높은 수준의 발현을 구동하기 위해 구성적으로 활성인 프로모터를 이용하였다. 구성적 FoxP3 발현이 IPEX HSPC 유전자 요법에 적합한 전략인지를 결정하기 위해, 본 발명자들은 먼저 HSPC 생착 및 기능에 대한 이소성 FoxP3 발현의 효과를 결정하도록 설정하였다. 여기서, 본 발명자들은 높은 수준의 FoxP3(MNDU3-FoxP3-IRES-GFP)을 발현하는 LV를 이용하고 이의 효과를 대조군 벡터(MNDU3-GFP)와 비교하였다. MNDU3-FoxP3-IRES-GFP로 형질도입된 뮤린 lin-세포는 생존력에 대한 식별가능한 영향 없이 성공적인 LV 형질도입 및 발현(약 30%의 GFP+ 세포)을 나타내었다(도 8의 패널 A). LV-변형 세포를 마우스에게 이식하였을 때, 순환 CD45.1+(공여자) GFP+ 세포는 이식 후 7일째에 말초 혈액에서 쉽게 검출되었으며(도 8의 패널 B), 이는 세포가 조기 생착이 가능함을 시사한다. 그러나 이식 후 초기 기간(10 내지 21일)은 적혈구 수의 급격한 감소, 및 백혈구 및 혈소판 수의 재구성 실패로 표시되었으며(도 8의 패널 C), MNDU3-FoxP3-IRES-GFP를 이용하여 변형된 HSPC를 받은 마우스에서 60%의 사망률로 이어졌다(도 8의 패널 D). 인간 HSPC에 대한 구성적 FoxP3 발현의 효과를 결정하기 위해, NSG 신생아를 MNDU3-GFP 또는 MNDU3-FoxP3-IRES-GFP로 형질도입된 제대혈 CD34+ HSPC를 이용하여 인간화하였다. 형질도입 후 3일째에 GFP+ 세포에서 세포 사멸이 관찰되지 않았으며(도 8의 패널 E), 말초 혈액에서 hCD45+ 세포의 NSG 생착은 MNDU3-FoxP3-IRES-GFP로 형질도입된 HSPC를 받은 마우스에서 현저하게 손상되었다(도 8의 패널 F). 종합적으로, 이러한 결과는 HSPC에서 FoxP3의 이소성 발현이 조혈에 부정적인 영향을 미친다는 것을 시사한다.

[0148] **FoxP3 발현을 위한 계통 특이적 렌티바이러스 벡터의 개발**

[0149] 이소성 FoxP3 발현에 의한 손상된 조혈에 대한 본 발명자들의 관찰로 인해, 본 발명자들은 발달적으로 적절한 FoxP3 발현을 부여할 LV를 설계하고자 하였다. 이러한 작업을 수행하기 위한 주요 과제는 8 내지 10 kb의 LV 게놈 크기를 초과하지 않는 주요 FOXP3 조절 요소를 포함하는 것이며, 상기 크기를 초과하면 LV는 좋지 않은 역가 및 형질도입 효율을 나타낸다. 내인성 FoxP3 발현을 반복하기 위해, 본 발명자들은 FOXP3 유전자 내에 3가지의 앞서 특성화한 보존된 조절 영역, 즉 보존된 비코딩 서열(CNS) 1, CNS2, 및 CNS3을 이용하였다(도 9a). 3가지 CNS 요소를 FOXP3 프로모터의 상류에 첨가하고, FOXP3 3'UTR을 발현 카세트 다음에 첨가하였다(도 9b). 이러한 작제물을 바이러스 3' LTR 영역에서 앞서 기재한 인핸서 차단 절연체 요소("A2")의 첨가로 VSV-G-의사형, 3세대, 자가-불활성화(SIN) LV(Dull *et al.* 1998)로 클로닝하여 잠재적으로 안전성을 개선시키고 발현의 위치 변이를 감소시켰다(Liu *et al.* 2015). 형광 리포터 m스트로베리의 발현만 구동하는 이러한 작제물(본원에서는 "CNS123p-m스트로베리"로 지칭함), 또는 2A 요소 연결을 통해 FOXP3 cDNA 및 m스트로베리의 발현을 구동하는 작제물("CNS123p-m스트로베리")을 사용하여 2가지 LV를 설계하였다.

[0150] **내인성으로 조절된 CNS123p-m스트로베리는 Treg 계통에 대한 높은 특이성을 나타낸다**

[0151] 본 발명자들은 먼저 상이한 조혈 계통(K562[적혈골수세포, FoxP3-], 주르카트[Tconv-유사, FoxP3-] 및 MT-2[Treg-유사, FoxP3+], 도 10의 패널 A) 유래의 인간 세포주에서 CNS123p-m스트로베리 리포터 LV의 특이성을 평

가하였다. 유세포분석에 의한 형질도입된 세포의 분석은 심지어 매우 높은 벡터 복제 수(최대 약 25개 복제물/세포)에서도, FoxP3- 세포 유형에서 발현의 낮은 고유 "누출"을 갖는 FoxP3+ MT-2 세포로 제한되는 m스트로베리 발현을 나타냈다(도 10의 패널 B). 높은 수준의 FoxP3을 정상적으로 발현하는 MT-2 세포에서, m스트로베리의 평균 형광 강도(MFI)는 복제 수의 증가에 따라 선형적으로 증가하였다(도 10의 패널 B). 이러한 결과는 CNS123p 요소가 FoxP3+ 세포에서 매우 특이적인 유전자 발현을 부여하고, 부적절한 세포 유형에서 기저 발현이 부족함을 시사한다.

[0152] CNS123p-m스트로베리 리포터 LV의 생체 내 계통 특이성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 뮤린 유사유전자형 이식 시스템을 사용하여 조혈 발달 과정에 걸쳐 형질도입된 HSPC 및 이의 자손에서의 LV 발현을 평가하였다. 여기서, 본 발명자들은 FoxP3-GFP 리포터 마우스(FoxP3 및 GFP를 공동 발현함)의 골수 유래의 CD45.2 계통-마커-음성(lin-) HSPC를 CNS123p-m스트로베리를 이용하여 형질도입하고, 변형된 세포를 유사유전자형 CD45.1 수용자에게 이식하였다(도 10의 패널 c). 이식 후 20주째에, m스트로베리 발현을 공여자 CD45.2 세포의 조혈 계통(도 14에 나타낸 계통 게이팅)에서 평가하였다. 여기서, 본 발명자들은 CNS123p-m스트로베리로부터의 m스트로베리 발현이 내인성 FOXP3 유전자로부터의 GFP 발현에 밀접하게 일치하였음을 관찰하였다. m스트로베리 발현은 Treg 계통(CD4+GFP+)으로 제한되었으며, cKit+ HSPC, B220+ B 세포, Gr1+ 과립구, CD8+ T 세포, 및 CD4+GFP- Tconv 세포에서 m스트로베리 발현은 무시할 수 있었다(도 9의 패널 D 및 E). 이러한 결과는 CNS123p-m스트로베리의 발현이 조혈 발달 과정에 걸쳐 내인성 FoxP3 발현과 매우 일치함을 시사한다.

[0153] **스컬피 마우스 유래의 FoxP3-결핍 HSC의 LV 보정은 억제 기능을 가진 기능성 Treg를 생성한다**

[0154] 그 다음으로, 본 발명자들은 CNS123p-FoxP3-m스트로베리 LV가 스컬피(FoxP3-결핍) HSC에서 생리적 FoxP3 발현의 회복을 통해 기능적 Treg 발달을 가능하게 할 수 있는지 여부를 결정하였다. 스컬피 마우스는 FOXP3의 포크헤드 영역에 프레임시프트 돌연변이를 보유하고, 자가면역 반응을 억제할 수 없는 비기능적(FoxP3-) Treg를 생성한다. 치료의 부재시, 스컬피 마우스는 출생 후 약 21일째에 시작하여 치명적인 림프증식성 장애에 걸린다. 따라서, 충분한 수의 스컬피 HSC를 수득하기 위해, 신생아 스컬피 마우스(CD45.2)를 출생시에 WT 비장세포(CD45.1)의 주사에 의해 구제하여 성인으로 생존할 수 있게 하였다. 기능성 Treg 발달의 회복을 평가하기 위해, 본 발명자들은 CD45.2 HSPC의 3가지 상이한 공급원, 즉 (1) CNS123p-m스트로베리를 이용하여 형질도입된 스컬피 lin- 세포, (2) CNS123p-FoxP3-m스트로베리를 이용하여 형질도입된 스컬피 lin- 세포, 및 (3) CNS123p-m스트로베리를 이용하여 형질도입된 WT FoxP3-GFP lin- 세포 중 하나를 이용하여 WT CD45.1 수용자를 이식하였다(도 11의 패널 A).

[0155] 이전 연구는 lck 근위(흉선세포 특이적) 프로모터 하 FoxP3의 과발현이 흉선림프구증식을 크게 변경시킬 수 있음을 보여 주었고(Khattri *et al.* 2001), 따라서 본 발명자들은 계통-특이적 CNS123p-FoxP3-m스트로베리 LV가 흉선세포 분화를 변경시키는지 여부를 평가하였다. 여기서, 본 발명자들은 재구성된 공여자 흉선세포 내의 계통 분포가 WT, 스컬피, 또는 보정한 스컬피 HSC를 이용하여 이식된 수용자 마우스 사이에 상이하지 않음을 관찰하였으며(도 11의 패널 B), 이는 FoxP3 cDNA의 계통 특이적 회복이 흉선세포 계통 분포를 변경하지 않았음을 시사한다.

[0156] 그 다음에, 본 발명자들은 수용자 흉선에서 보정한 스컬피 Treg(cSf-Treg)의 빈도를 평가하였다. WT FoxP3-GFP HSC를 이용하여 재구성된 이식 수용자는 CD4 단일 양성(CD4 SP) 집단 내에서 3.7±0.6%(평균 ±SD) GFP+ 세포를 나타낸 한편, LV-보정한 스컬피 HSC를 이용하여 재구성된 수용자는 2.1±0.4% m스트로베리+ 세포를 나타내었으며, 이는 보정한 스컬피 HSPC가 FoxP3을 발현하는 CD4 SP 흉선세포를 생성함을 확인시켜준다(도 11의 패널 C). GFP+ 또는 m스트로베리+ 공여자 흉선세포를 Treg 표면 마커의 발현에 대하여 추가로 평가하였다. 흉선에서 보정하지 않은(FoxP3-) Sf-Treg는, WT-Tregs에 비하여 Treg 표면 마커 CD25 및 GITR의 발현 감소를 나타내었다(도 11의 패널 C). 대조적으로, 최고 수준의 LV 발현을 갖는 cSf-Treg(m스트로베리 높음(mStrawberryhigh))는 WT-Treg와 비슷한 CD25 및 GITR 발현을 나타내었으며, 이는 CNS123p-FoxP3-m스트로베리 유래의 FoxP3의 발현이 흉선에서 표현형 Treg 발달을 회복시킨다는 것을 시사한다.

[0157] 그 다음에, 본 발명자들은 비장 cSf-Treg의 억제 기능을 특성화하였다. 이식 수용자의 비장 유래의 추정 Treg의 3가지 그룹(Sf-Treg, cSf-Treg, 및 WT-Treg)을 FACS 분류하고(도 11의 패널 D), 1:1의 억제자 대 이펙터 비율에서 WT CD4 T 세포 증식을 억제하는 상기 Treg의 능력에 대해 평가하였다(도 11의 패널 E). 예상한 바와 같이, 보정하지 않은(FoxP3-) Sf-Treg는 대조군(Treg 없음)에 비하여 T 세포 증식을 억제하지 못하였다. 그러나, cSf-Treg는 WT-Treg와 동등한 상당한 억제 능력을 나타내었으며, 이는 CNS123p-FoxP3-m스트로베리가 기능적 능력을 갖는 보정한 Treg를 생성함을 확인시켜 주었다.

[0158] 흉선에서 유도된 Treg(nTreg)에 추가적으로, FoxP3은 또한 면역관용의 맥락에서 Tconv가 강한 TCR 신호를 받을 때 발생하는 말초 Treg(pTreg)의 생성에서 중요한 역할을 한다(Curotto de Lafaille *et al.* 2004). 이 과정은 억제 기능을 갖는 FoxP3+ 유도된 Treg(iTreg)를 생성하는 TGFβ의 존재 하에 FoxP3- Tconv 세포의 TCR 자극을 통해 시험관 내에서 모의될 수 있다(Chen *et al.* 2003). 보정한 스컬피 CD4 Tconv 세포가 iTreg를 생성할 수 있는지 여부를 결정하기 위하여, cSf Tconv(CD4+m스트로베리-) 세포 또는 WT Tconv(CD4+GFP-) 세포를 FACS 분류하고 TGFβ의 존재 하에 CD3/CD28 비드를 사용하여 활성화시켰다. TGFβ를 이용한 활성화 후 4일째에, cSf Tconv는 m스트로베리의 강력한 유도를 나타내었으며(도 11의 패널 F), 이는 보정한 Sf-Tconv 세포가 새롭게 FoxP3 유도를 할 수 있음을 입증한다. 종합적으로, 본 발명자들의 데이터는 스컬피 HSC의 LV 보정이 기능적 Treg 구획의 생리적 회복을 촉진시킨다는 것을 시사한다.

[0159] **계통-특이적 FoxP3 LV(CNS123p-FoxP3-m스트로베리)는 스컬피 마우스를 구제할 수 있는 Treg를 생성한다**

[0160] Treg 기능의 가장 엄격한 시험은 생체 내 자가면역 억제를 통해 신생아 스컬피 마우스에서 임상 질환 징후를 역전시키는 능력이다. 이를 위해, 본 발명자들은 먼저 LV-보정한 lin- HSPC를 이용하여 신생아 스컬피 마우스를 이식하려고 시도하였다. 신생아 스컬피 마우스를 500 Rad 전신 방사선조사(TBI)로 컨디셔닝시키고, WT HSPC, 보정하지 않은 Sf HSPC, 또는 보정한 Sf HSPC로 i.p 주사하였다. 장기 생존은 공여자 세포의 (비록 낮은 수준이지만) 검출가능한 생착에도 불구하고 모든 그룹에서 불량하였으며, 이는 스컬피 모델에서 정제된 HSPC 이식의 낮은 효능을 시사한다(도 15).

[0161] 본 발명자들은 WT HSPC(FoxP3-충분 HSPC에 대한 양성 대조군)를 이용하여 이식한 스컬피 마우스에서의 불량한 생존이 HSPC가 성숙한 Treg를 생성하여 이러한 모델 시스템에서 자가면역 반응을 제어하기 전에 오랫동안 발생하는 불가역적 다기관 자가면역 손상의 빠른 발병으로 인한 것일 수 있다고 추측하였다. 따라서, 본 발명자들은 성숙한 Treg가 WT 수용자 마우스로의 HSPC 이식에 의해 생성되고 추후 스컬피 신생아에 대한 입양 전달을 위해 정제되는 대안적인 접근법을 추구하였다. 스컬피 또는 WT HSPC(lin-CD45.2+)를 CNS123p-m스트로베리 또는 CNS123p-FoxP3-m스트로베리 LV를 이용하여 형질도입하고 유사유전자형 WT 수용자(CD45.1)에게 이식하였다. 이식 후 8주째에, 공여자 CD45.2+CD4+ 세포를 이식 수용자의 비장으로부터 정제하여 추정 Treg를 함유하는 벌크 CD4+ 세포의 3가지 그룹, 즉 보정하지 않은 스컬피 CD4+(Sf-CD4+), 보정한 스컬피 CD4+(cSf-CD4+), 또는 야생형 CD4+(WT-CD4+)를 수득하였다(도 12의 패널 A). 전달 전 정제된 CD45.2+CD4+ 세포의 FACS 분석은 검출가능한 오염성 수용자 CD45.1 세포없이 약 95%의 CD4+ 순도를 나타내었다(도 16).

[0162] 8.6×10^5 내지 2.1×10^6개의 추정 Treg를 나타내는 정제된 CD45.2+CD4+ 세포(GFP+ 또는 m스트로베리+, 도 16)를 스컬피 신생아에게 복강내 주사하였다. 21일령째, 스컬피 마우스를 자가면역 표현형의 보정에 대해 분석하였다. 21일령 비처리(허위 PBS 주사) 스컬피 신생아는 비늘에 덮인 피부, 작고 두꺼운 귀(도 12의 패널 B), 및 비종대(도 12의 패널 C)를 포함한 질환 진행의 전형적인 표현형 징후를 나타내었다. 비처리 마우스는 또한 연령이 일치한 WT 대조군에 비하여 높은 백분율의 활성화된 CD62L-CD44+ CD4 T 세포(도 12의 패널 D) 및 염증성 혈청 사이토카인의 수준 증가(도 12의 패널 E)를 포함하는 염증성 면역 표현형을 나타내었다. 세포당 3 초과의 VC를 함유하는 WT-CD4 및 cSf-CD4 세포의 투여는 스컬피 표현형의 모든 측정값의 완전한 보정을 초래하여, 이러한 마우스가 연령이 일치한 WT 대조군과 표현형적으로 구별될 수 없었다. 대조적으로, 보정하지 않은 Sf-CD4 세포를 받은 스컬피 마우스는 BMT 및 CD4 정제 절차가 이식 수용자로부터 어떠한 오염성 CD45.1 WT Treg로 이어지지 않음을 확인하는 질환 개선 징후를 나타내지 않았다. 또한, VCN이 2 미만인 cSf Treg를 받은 스컬피 마우스는 스컬피 표현형의 불완전한 보정을 나타내었으며(도 16), 이는 이 모델에서 생체 내 억제 능력을 갖는 Treg를 생성하기 위해 높은 수준의 유전자 변형이 필요하다는 것을 시사한다. 종합적으로, 이들 결과는 FoxP3-결핍 HSC의 LV 보정이 생체 내에서 자가면역 반응을 억제할 수 있는 CD4+ Treg를 생성한다는 것을 입증한다.

[0163] **CNS123p-m스트로베리 LV는 인간화 마우스 모델에서 독성 없이 높은 수준의 계통 특이적 발현을 나타낸다**

[0164] IPEX 환자에 대한 이러한 요법의 적용가능성을 평가하기 위해, 그 다음에 본 발명자들은 인간화 이종이식 모델에서 CNS123p-m스트로베리 리포터 LV의 발현 패턴을 탐구하였다. 제대혈로부터 단리한 건강한 인간 CD34+ HSPC를 CNS123p-m스트로베리를 이용하여 형질도입하고 NSG 신생아에게 이식하였다(도 13의 패널 A). 생착된 hCD45+ 세포를 이식 후 12 내지 16주째에 분석하였다. NSG BM에서 생착된 인간 세포당 벡터 복제물의 평균 ± SD 수는 4.1±2.5이었으며, 이는 LV를 이용한 LT-HSC의 효율적인 변형을 시사한다. BM에서 생착된 인간 CD45+ 세포는 이러한 모델 시스템의 전형적인 계통 분포를 나타내었으며(59% CD19+ B 세포, 10% CD33+ 골수 세포, 2.5% CD34+ HSPC, 3.3% CD3+ T 세포, 도 17), 이는 무증상의 이식편대숙주질환 및 T 세포 활성화로부터의 잠재적인 인공물의 부재를 나타낸다.

[0165] 각각의 조혈 계통에서 CNS123p-m스트로베리로부터 m스트로베리 발현을 결정하기 위해 유세포분석에 의해 세포를 분석하였다(도 13의 패널 B 및 C). BM에서 m스트로베리 발현은, CD33+ 골수, CD19+ B 세포, 또는 CD34+ HSPC 계통에서 검출가능한 발현 없이 CD3+ T 세포로 제한되었다. 흉선에서, m스트로베리 발현은 DN, DP, CD4SP, 또는 CD8SP 단계에서 최소 발현으로 CD4+CD25+ Treg(평균 36% m스트로베리+)에 대해 선택적이었다. 비장에서, m스트로베리 발현은 CD4+CD25+ Treg(46% m스트로베리+)에서 가장 높았으며, 이 때 더 낮은 수준의 발현이 CD4+CD25- Tconv 세포(17% m스트로베리+) 및 CD8+ T 세포(4% m스트로베리+)에서 관찰되었다. 분석된 각각의 마우스에 있어서, m스트로베리 형광의 강도는 CD4+CD25+ Treg 서브세트에서 가장 컸다(도 13의 패널 B).

[0166] CD25는 FoxP3+ Treg를 식별하는 유용한 표면 마커인 한편, CD25는 또한 활성화된 T 세포에서 발현되지만, FoxP3+ Treg에 대해 특이적이지 않다. 따라서, 본 발명자들은 세포내 FoxP3 염색으로 CNS123p-m스트로베리의 Treg 계통 특이성을 보다 엄격하게 결정하였다. 여기서, 본 발명자들은 NSG-SGM3 마우스를 이용하였으며, 상기 마우스는 전통적인 NSG 모델에 비하여 향상된 수의 FoxP3+ Treg를 생성한다(Billerbeck *et al.* 2011). 인간 제대혈 CD34+ HSPC를 CNS123p-m스트로베리를 이용하여 형질도입하고, NSG-SGM3 신생아에게 이식하였다. 이식 후 12주째에, 인간 CD4+ 세포를 비장으로부터 단리하고 FoxP3 염색 이전에 m스트로베리+ 및 m스트로베리- 집단으로 FACS-분류하였다(도 13의 패널 D). 본 발명자들은 m스트로베리+ 세포의 81%가 또한 foxP3+인 한편, m스트로베리- 세포의 단지 2.5%만이 FoxP3+임을 관찰하였으며, 이는 인간화 마우스 모델에서 CNS123p-m스트로베리 발현 및 내인성 FoxP3 발현의 높은 일치성을 시사한다.

[0167] MNDU3 프로모터로부터 구성적 FoxP3 발현을 조사하는 본 발명자들의 이전 연구는 HSC에서 비정상 FoxP3 발현이 생착에 해롭다는 것을 시사하였다. 따라서, 본 발명자들은 CNS123p-FoxP3-m스트로베리(HSPC에서 발현하지 않음)를 사용하는 본 발명자들의 계통-특이적 발현 전략이 경쟁 이식 모델에서 효율적인 HSC 생착을 가능하게 한다는 것을 확인하고자 하였다. CD34+ "시험 세포"를 CNS123p-m스트로베리 또는 CNS123p-FoxP3-m스트로베리를 이용하여 형질도입하였으며, 동일한 수의 형광으로 표지된(UBC-m시트린 형질도입) 경쟁자 세포와 조합하고, 신생아 NSG 마우스에게 이식하였다(도 13의 패널 E). 이식 후 12주째에, 형광으로 표지된 경쟁자 세포의 상대적인 비율을 CD34+ 계통 내에서 평가하였다. 여기서, 본 발명자들은 그룹 간의 경쟁자 세포의 상대적인 비율에 차이가 없음을 관찰하였다. 이는 MNDU3-FoxP3으로부터의 구성적 FoxP3 발현과 달리, CNS123p-FoxP3-m스트로베리로부터의 계통-특이적 FoxP3 발현은 HSC 생착에 대하여 어떠한 해로운 영향도 나타내지 않음을 시사한다.

[0168] 그 다음으로, 본 발명자들은 CNS2 메틸화가 LV 발현을 조절하는 작용을 하는 역할을 평가하였다. 흉선림프구증식 동안 CNS2 영역의 활성 탈메틸화는 Treg 계통에 대한 유전적인 투입을 유도하는 중요한 사건이다(Toker *et al.* 2013). 탈메틸화 CNS2는 FoxP3 프로모터에 대한 인핸서 기능을 통해 안정적인 높은 수준의 FoxP3 발현을 유지하며(Zheng *et al.* 2010; Li *et al.* 2014a), 따라서 본 발명자들은 CNS123p-FoxP3-m스트로베리 내에 함유된 바이러스 CNS2 요소 내 CpG 메틸화 패턴을 평가하는 데 관심이 있었다. 여기서, 본 발명자들은 LV-형질도입된 CD34+ CB 세포를 이용하여 재구성된 NSG 마우스로부터 비장을 단리하고 Tconv 세포(CD4+CD25-) 및 Treg(CD4+CD25+)에 대하여 풀링된 비장세포를 분류하였다(도 13의 패널 F). Tconv 및 Treg 서브세트 유래의 게놈 DNA를 각각의 서열에 특이적인 파이로시퀀싱 프라이머를 이용하여 내인성 및 바이러스 CNS2에 존재하는 9개의 조절된 CpG 부위의 메틸화에 대하여 분석하였다. 예상한 바와 같이, 내인성 FOXP3 CNS2 내의 CpG 부위는 분류된 Tconv 세포에서 메틸화되고 분류된 Treg에서 탈메틸화되었다. 흥미롭게도, 바이러스 CNS2는 두 집단 모두에서 완전히 탈메틸화된 상태를 유지하였으며, 이는 바이러스 CNS2가 HSC로부터 Treg 분화 동안 내인성 CNS2와 동일한 방식으로 조절되지 않음을 시사한다.

[0169] **논의**

[0170] 2001년에 IPEX 및 스컬피에 있어서 돌연변이가 있는 원인 유전자로서 FoxP3의 유전적 특성화 이후로(Wildin *et al.* 2001b; Bennett *et al.* 2001), 많은 연구가 면역관용을 유지하는 데 있어서 FoxP3+ Treg에 대한 주요 역할을 추가로 설명하였다. Treg의 완전한 부재에서 생긴 심각한 자가면역은 IPEX를 인간 Treg 발달 및 면역관용의 메커니즘에 대한 본 발명자들의 이해를 넓히는 데 매우 유용한 질환으로 만든다.

[0171] 안전성 프로파일이 개선된 HSC로의 효율적인 바이러스 유전자 전달을 초래하는 최근 개발로 유전자 요법 분야의 범위가 크게 확장되어 광범위한 유전적 혈액 장애에 대한 효과적인 I/II상의 임상 시험이 이루어졌다(Morgan *et al.* 2017). 이러한 접근법의 최근 성공을 고려하여, 본 발명자들은 개발중인 조혈 시스템 내에서 생리적 FoxP3 발현을 회복시켜, 기능적 Treg의 발달 및 자가면역의 해결을 초래할 수 있는, IPEX를 치료하기 위한 LV-기반 요법을 개발하고자 하였다.

[0172] FoxP3은 세포 운명 결정에 주요 역할을 하는 전사 인자이므로, 따라서 본 발명자들은 조혈 시스템 전체에 걸쳐

부적절한 FoxP3 발현이 정상적인 조혈 발달 및 장기 생착에 해로울 수 있다고 추측하였다. 실제로, 본 발명자들은 구성적 MNDU3 프로모터에 의해 구동된 구성적 FoxP3 발현이 인간 및 뮤린 HSPC 이식 모델에서 장기 생착의 손상을 초래함을 관찰하였다. 이러한 관찰은 강력한 흉선 프로모터 하에서 높은 수준의 FoxP3 발현이 비정상적인 흉선림프구증식 및 흉선세포의 발달에 있어 세포사멸의 증가를 초래함을 나타내는 이전 연구와 일치한다(Khattri *et al.* 2001; Tai *et al.* 2013). 흥미롭게도, 산토니 드 시오(Santoni de Sio)외 다수는 HSC 생착의 향상을 관찰하였지만, 구성적으로 활성인 EF1a 프로모터 하에서 FoxP3을 발현하는 LV를 이용하여 형질도입된 제대혈 HSPC로부터 비정상적인 T 세포 발달을 관찰하였다(Santoni de Sio *et al.* 2017). 이러한 상충되는 결과는 상이한 수준의 구성적 FoxP3 발현(EF1a 대 MNDU3 프로모터의 상대적인 강도에 의해 구동됨)이 HSC 생물학에 차별적인 효과를 미칠 수 있다는 것을 시사할 수 있다. 종합적으로, 본 발명자들 및 다른 이들의 발견은 IPEX 증후군에 대한 이상적인 HSC-기반 유전자 요법이 비정상적이고 편재적인 FoxP3 발현을 회피해야 한다는 것을 시사한다.

[0173] 비정상적인 FoxP3 발현의 유해한 영향을 회피하기 위해, 본 발명자들은 인간 FOXP3 유전자의 내인성 요소를 사용하여 발달적으로 적절한 FoxP3 발현을 부여하는 LV를 설계하였다. 계통-특이적 LV를 설계하는 데 있어서 주요 과제 중 하나는 높은 cDNA 발현 수준을 촉진시키면서 동시에 소형 LV 게놈을 유지할 수 있는 내인성 FOXP3 인핸서 요소를 유지하는 것이다. 큰 LV 게놈은 전형적으로 역가 감소 및 형질도입 효율 감소를 나타내므로(Kumar *et al.* 2001; Cante-Barrett *et al.* 2016), 따라서 HSC의 치료적 보정을 달성하기가 어렵다. 이는 유전자좌 제어 영역(LCR) 유래의 큰 인핸서 요소를 함유하는 LV를 사용하여 인간 β-글로빈 유전자의 적혈구-특이적 발현을 구동하여 이상혈색소증을 치료하려는 임상 노력에서 쉽게 명백해졌다(Cavazzana-Calvo *et al.* 2010). 따라서, 본 발명자들은 높은 역가(FoxP3 cDNA 벡터에 대한 원래 역가는 2.25×106이었음)를 나타내고, 뮤린 및 인간 HSC에서 높은 복제 수를 달성할 수 있으며, Treg 계통 내에서 치료적 수준의 FoxP3 발현을 나타내는 7.0 kb의 계통-특이적 LV를 설계하였다. 이들 모든 인자는 IPEX 환자의 치료에 유리한 임상적 해석을 시사한다.

[0174] Treg-특이적 발현을 갖는 LV를 설계하기 위해, 본 발명자들은 ENCODE 데이터베이스에 포함된 정보를 이용하여 FOXP3 및 중요한 Treg-특이적 인핸서 영역으로 확인된 CNS1, CNS2, 및 CNS3에서 Treg-특이적 DN아제의 영역을 확인하였다. 3가지 CNS 영역은 고도로 보존되고 이전에 FoxP3 발현 및 Treg 발달에 대한 각각의 영역의 유전자 제거 효과를 나타내는 마우스 모델로 잘 특성화되었다(Zheng *et al.* 2010). CNS3은 "개척자 요소"로 특성화되었으며, 흉선세포 Treg 발달 동안 FoxP3 발현의 초기 유도에 중요하다. CNS1은 다수의 Smad 결합 부위를 갖는 TGF β 반응성 요소인 것으로 간주되며, pTreg의 유도에 중요하다. CNS2는 결정된 Treg에서 안정적인 FoxP3 발현을 유지하는 역할을 한다(Li *et al.* 2014). 최근의 증거는, CNS2의 탈메틸화가 CNS2 인핸서 영역이 결정된 Treg에서 높은 수준의 FoxP3 발현을 구동할 수 있게 하는 흉선 Treg 발달 동안 Tet 효소에 의해 개시된 활성 과정임을 시사하였다(Toker *et al.* 2013; Yue *et al.* 2016). 흥미롭게도, 본 발명자들은 NSG Tconv/Treg 서브세트 각각에서 내인성 CNS2 메틸화/탈메틸화의 예측된 패턴을 관찰한 반면, 바이러스 CNS2 서열은 모든 서브세트에서 완전히 탈메틸화되었다. 이는 (LV 형질도입을 통한) HSC 상태에서 탈메틸화된 CNS2 영역의 도입이 LV 내의 이러한 영역이 발달 전체에 걸쳐 탈메틸화 상태를 유지할 수 있게 하며; 대조적으로, 내인성 FOXP3 유전자는 흉선림프루증식 및 Treg 발달 동안 일어나는 특이적 탈메틸화에 의해 배발생 초기에 전체적으로 메틸화될 수 있음을 시사한다. 내인성 CNS2 메틸화와 바이러스 CNS2 메틸화 사이의 불일치에도 불구하고, LV 발현은 Treg 계통에 대하여 매우 선택적으로 유지되며, 이는 탈메틸화된 CNS2 단독이 FoxP3 발현을 구동시키지 않고, CNS1, CNS3, 및 FoxP3 프로모터가 추가적인 특이성을 부여할 수 있음을 시사한다. 또한, CNS2의 과메틸화는 FoxP3 발현 감소(Li *et al.* 2014) 및 자가면역 장애가 있는 환자에서 Treg 기능 손상(Guo *et al.* 2016)과 연관되어 있으므로, 이러한 기능성은 탐구되어야 하는 상태로 남아 있지만, 탈메틸화된 CNS2를 유지하는 LV가 자가면역 장애에서 FoxP3 발현을 개선시키는 데 유리할 수 있음을 추측하는 것은 솔깃한 일이다.

[0175] FoxP3+ Treg는 중심 관용 신호 하에서 흉선에서(nTreg), 또는 관용-유도 신호에 반응하여 말초 FoxP3- Tconv로부터(pTreg) 둘 다에서 발생한다. 하리바이(Haribhai)외 다수에 의한 중심 연구는, nTreg 및 pTreg 서브세트 둘 다 스컬피 마우스에서 자가면역 결함을 제어하는 데 간결한 역할을 하며, 자가-항원에 대하여 면역관용의 기초적인 유지에 중요함을 시사하였다(Haribhai *et al.* 2011). 따라서, IPEX에 대한 효과적인 요법은 흉선 및 말초 Treg 둘 다의 발달을 이상적으로 회복시킬 것이다. 계통 특이적인 방식으로 FoxP3 cDNA를 발현하는 것이 Treg 기능 및 표현형을 회복시키기에 충분한 FoxP3 발현 수준을 달성할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, 본 발명자들은 스컬피 HSC에서 CNS123p-FoxP3-m스트로베리를 시험하였다. nTreg 발달의 회복은 보정한 스컬피 흉선세포에 의해 나타나는 Treg 표현형(GITR+, CD25+), 및 CD4+m스트로베리+ 비장세포의 시험관 내 억제 능력에 의해 입증된다. 본 발명자들의 연구는 또한 TGFβ의 존재 하에서 활성화시 새롭게 FoxP3 발현을 유도하는 보정한 스컬피

CD4 세포의 능력에 의해 입증된, pTreg 구획의 회복을 시사한다.

[0176] 임상적 해석 전 고려할 중요한 인자는 IPEX 환자에서 자가면역을 해결하는 데 필요한 HSC 보정 및 생착 수준이다. IPEX 환자에서 동종이계 HSC 이식의 보고는 성공적인 자가면역의 해결이 부분 공여자 키메리즘으로 달성될 수 있음을 입증한다(Barzaghi *et al.* 2018). 이러한 경우 중 일부에서, 공여자 Treg는 총 공여자 생착의 낮은 수준에도 불구하고 Treg 구획에서 완전한 공여자 키메리즘과 함께 선택적 이점을 나타내는 것으로 나타났다(Kasow *et al.* 2011; Seidel *et al.* 2009). CD4+ 세포의 입양 전달을 이용하여 스컬피 신생아를 구제하는 본 발명자들의 연구에서, 정제된 CD4 산물 중 3 초과의 VCN은 자가면역을 보정하기 위해 FoxP3 발현이 충분히 높은 Treg를 생성하는 데 필요하였다. 이는 LV 작제물에 포함된 FoxP3 인핸서의 본 발명자들의 설계된 조합이 내인성 유전자보다 FoxP3 발현을 촉진시킬 때 덜 효율적일 수 있거나, 대안적으로 LV에 포함된 인간 조절 요소가 뮤린 세포에서 최적이 아닌 발현을 제공함을 시사할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 본 발명자들의 NSG 이종이식 연구는 3 초과의 VCN이 인간 CD34+ 세포에서 용이하게 달성될 수 있음을 나타낸다. 추가 연구는 인간 IPEX HSC로부터 기능적 Treg의 발달을 회복시키는 데 필요한 보정 VCN을 평가하는 것을 목표로 할 것이다.

[0177] 요약하면, 본 발명자들은 FoxP3-결핍 HSC로부터 Treg 발달을 성공적으로 회복시키는 내인성으로 조절된 LV의 개발을 입증한다. 보정한 Treg는 표현형 및 기능에서 WT Treg와 매우 유사하며, 중요한 것은 스컬피 마우스의 자가면역 표현형을 역전시킬 수 있다는 점이다. 또한, 인간화 마우스 모델은 LT-HSC의 효율적인 유전자 변형 및 높은 수준의 계통-특이적 발현을 나타내며, 이는 IPEX 환자에 대한 이러한 요법의 유리한 해석을 시사한다. 보다 광범위하게, 이러한 연구는 면역관용을 회복시키는 HSC 수준에서 면역계를 재프로그래밍하는 첫번째 실증을 나타낸다. IPEX가 희귀 질환인 반면, 이의 중증도 및 적합한 치료의 부재는 상기 질환을 면역관용을 조절하는 새로운 HSC-기반 요법의 개발에 대한 생물학적 이해를 제공하는 우수한 관문 질환이 되게 한다. 이러한 결과는 자가 HSCT에 의한 IPEX 환자의 치료를 위한 길을 열어주며, 상이한 기원의 자가면역 장애를 가진 환자를 위한 새로운 치료에 대한 귀중한 이해를 제공할 수 있다.

[0178] **재료 및 방법**

[0179] **렌티바이러스 벡터**

[0180] MNDU3-GFP(Logan *et al.* 2004) 및 UBC-m시트린(Baldwin *et al.* 2015)의 구성은 기재된 바 있다. MNDU3-FoxP3-IRES-GFP는 게이 크룩스(Gay Crooks) 박사의 친절한 선물이었다. CNS123p-m스트로베리 및 CNS123p-FoxP3-m스트로베리 렌티바이러스 벡터를 빈 CCL 백본으로 클로닝하였다(Dull *et al.* 1998). 엔이빌더(NEBuilder)(R) 하이파이(HiFi) DNA 어셈블리 키트(뉴잉글랜드 바이오랩스(New England Biolab))를 사용하여 클로닝될 양립가능한 말단을 갖는 g블록(gBlock)(R)으로서 단편을 합성하였다. 렌티바이러스 벡터를 VSV-G 위형으로 패키징하고, 기재된 바와 같이 농축 및 적정하였다(Cooper *et al.* 2011).

[0181] **세포주**

[0182] MT2 세포는 NIH의 NIAID 에이즈 부서(Division of AIDS)의 NIH AIDS 시약 프로그램을 통해 수득하였다(더글라스 리치만(Douglas Richman) 박사로부터 MT-2 세포 수득)(Haertle *et al.* 1988; Harada, Koyanagi, and Yamamoto 1985). 주르카트 및 K562 세포를 ATCC로부터 수득하였다. 세포를 R10(RPMI[깁코(Gibco)]/10% FBS[깁코]/1× 페니실린/스트렙토마이신/글루타민[PSG, 제미니 바이오 프로덕츠(Gemini Bio Products)]) 중에 유지시켰다. 세포를 1E6 세포/mℓ로 도말하고, 다양한 농도(1E5 TU/mL 내지 1E8 TU/mL, MOI 0.1 내지 100)에서 CNS123p-m스트로베리를 이용하여 형질도입한 다음, 다음 날 새로운 R10으로 변경하였다. 배양 10일 후, m스트로베리 발현에 대해 유세포분석으로 세포를 분석하고, 벡터 복제 수 분석을 위해 게놈 DNA를 단리하였다.

[0183] **마우스**

[0184] 진단검사의학부(Division of Laboratory Medicine) 하의 UCLA 동물 연구 위원회(Animal Research Committee)가 승인한 프로토콜에 따라서 실험에 관여하는 모든 동물을 관리 및 취급하였다. B6(CD45.2), B6.SJL(CD45.1), B6-FoxP3GFP(CD45.2), B6-스컬피, NSG 및 NSG-SGM3 마우스를 잭슨 랩(Jackson labs)에서 구입하고 콜로니를 UCLA에서 유지시켰다. 다음 사육 전략을 스컬피 마우스에 사용하였다. 이형접합 암컷 스컬피 마우스(CD45.2, X/XSf, 표현형 정상)를 야생형 B6(CD45.2) 또는 B6.SJL(CD45.1) 수컷과 교배시켜 CD45.2, CD45.1, 및 CD45.1/CD45.2 스컬피 마우스의 서브콜로니를 생성하였다. 스컬피 수컷 신생아(Xsf/Y)를 60×10^{6}개의 WT 비장세포의 복강내 주사에 의해 구제하였고, 이형접합 스컬피 암컷(X/XSf)과 재교배하여 스컬피 암컷(Xsf/Xsf)을 수득하였다. 구제된 스컬피 수컷(Xsf/Y) 및 스컬피 암컷(Xsf/Xsf) 마우스를 교배하여 모든 새끼가 FoxP3 결핍인 새끼를 생산하였다.

수컷 및 암컷 스컬피 마우스는 구별할 수 없는 질환 진행을 나타내었고, 상호교환적으로 사용하였다.

[0185] **뮤린 유사유전자형 이식**

[0186] 무균 단리된 대퇴골, 경골, 골반, 척추, 및 상완골을 막자와 막자사발로 분쇄함으로써 골수 세포를 수득하였다. 제조자 지시에 따라 계통 고갈 키트(밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec))를 사용하여 lin- 세포를 수득하였다. lin- 세포를 뮤린 형질도입 배지(스템 스팬(Stem Span) SFEM[스템 셀 테크놀로지스(Stem Cell Technologies)], 1× PSG[제미니 바이오 프로덕츠], 100 ng/㎖ mTPO, 10 ng/㎖ mSCF[페프로테크(Peprotech)], 5 mg/㎖ 폴리브렌[시그마 알드리치(Sigma Aldrich)])에 2×10^6개 lin- 세포/㎖로 재현탁하였고, 레트로넥틴(retronectin; 타카라(Takara)) 코팅된 웰 상에 도말한 다음(RT에서 2시간 동안 20 ng/㎖), LV와 함께 밤새 배양하였다. 입양 전달을 위해 보정한 Treg를 생성하는 데 사용된 이식에서, 유전자 전달 효율을 개선시키기 위해 1 mg/㎖ 폴록사머 KP338(BASF)을 첨가하였다.

[0187] 형질도입 후, 세포를 수집하고, 세척한 다음, PBS 중에 재현탁시켰다. 6 내지 10주령의 B6.SJL(CD45.1) 또는 B6(CD45.2) 수용자를 투여 사이에 3 내지 4시간으로 600 + 600 Rad의 분할 조사를 사용하여 1200 Rad(투여 속도 약 100 Rad/분)로 조사하였다. 최종 방사선 투여 후 1 내지 4시간 째에 안구뒤 주사를 통해 세포를 주사하였다. 이식된 세포 용량은 마우스당 5E5 내지 1E6개 lin- 세포의 범위였다.

[0188] **세포 당 벡터 복제물(VC)의 결정**

[0189] 퓨어링크(PureLink) 게놈 DNA 키트(인비트로겐(Invitrogen))를 사용하여 샘플로부터 게놈 DNA를 추출하였다. ddPCR을 사용하여 평균 VC/세포를 측정하였다. 1× ddPCR 마스터 믹스(Master Mix)(바이오-래드(Bio-Rad)), 프라이머, 및 HIV-1 프사이(Psi) 영역에 특이적인 프로브(프라이머 및 프로브 각각에 대하여 400 nM 및 100 nM), DraI(40 U; 뉴잉글랜드 바이오랩스), 및 1.1㎕의 게놈 DNA 샘플을 함유하는 22㎕ 부피로 이루어진 반응 혼합물을 제조하였다. QX100 액적 생성기(Droplet Generator)(바이오-래드)를 사용하여 액적 생성을 수행하였다. 열 사이클링 조건은 95℃ 10분, 94℃ 30초 및 60℃ 1분(55 사이클), 98℃ 10분(1 사이클), 및 12℃ 유지로 이루어졌다. QX200 액적 판독기(Droplet Reader)/콴타소프트(Quantasoft) V1.7(바이오-래드)을 사용하여 특이적 증폭 부분의 농도를 정량화하고, 상염색체 인간 유전자 SDC4 유전자, 또는 뮤린 샘플을 위한 uc378 유전자에 대한 프라이머를 사용하여 표준화하였다. 프라이머/프로브 서열은 표 2에 열거되어 있다.

표 2

[0190] 벡터 복제 수의 ddPCR 정량화를 위한 프라이머 및 프로브 서열.

프사이US	서열	서열번호
정방향 프라이머	5' AAG TAG TGT GTG CCC GTC TG 3'	2
역방향 프라이머	5' CCT CTG GTT TCC CTT TCG CT 3'	3
프로브	5' FAM-CCC TCA GAC-ZEN*-CCT TTT AGT CAG TGT GGA AAA TCT CTA G-IBFQ** 3'	4
Uc378		
정방향 프라이머	5' CGC CCC CTC CTC ACC ATT AT 3'	5
역방향 프라이머	5' CAT CAC AAC CAT CGC TGC CT 3'	6
프로브	5' HEX-TTA CCT TGC-ZEN*-TTG TCG GAC CAA GGC A-IBFQ 3**	7
SDC4		
정방향 프라이머	5' CAG GGT CTG GGA GCC AAG T 3'	8
역방향 프라이머	5' GCA CAG TGC TGG ACA TTG ACA 3'	9
프로브	5' HEX-CCC ACC GAA-ZEN*-CCC AAG AAA CTA GAG GAG AAT-IBFQ** 3'	10
*IBFQ=아이오와 블랙(Iowa Blac)(등록상표)FQ, **ZEN=IDT-통합 DNA 기술의 내부 변형		

[0191] **뮤린 CD4 단리**

[0192] 무균 제거 및 70㎛ 메쉬 필터를 통한 비장의 온화한 분쇄에 의해 뮤린 비장세포를 수득하였다. 미리 준비한 염화암모늄 기반의 용해 완충액(BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))을 사용하여 RBC 용해를 수행하였다. CD4 단리 키트(밀테니 바이오텍)를 사용하여 비장세포를 CD4+ 세포에 대해 농축시켰다. 간략하게, 비장세포를 CD4- 세포를 표지화하는 바이오티닐화 항체의 칵테일을 이용하여 표지화한 다음, 항-바이오틴 자기 비드를 이용하여 표지화하였다. CD4- 세포를 LS 컬럼(밀테니 바이오텍) 상에서 분리하는 한편, CD4+ 세포를 통과액으로 수집하였다. 스컬피 신생아에 대한 CD45.2+CD4+ 세포의 입양 전달을 이용하는 실험에서, 항-CD45.1 바이오티닐화 항체를

초기 인큐베이션 단계에서 첨가하여 임의의 잔류 수용자 CD45.1 세포를 고갈시켰다.

[0193] **Treg 억제 분석**

[0194] CD4-농축 비장세포를 FACS 분류 전에 CD4-APC(클론 RM4-5, BD) 및 고스트(Ghost) 780 생존도 염료(톤보 바이오사이언시스(Tonbo Biosciences))로 표지화하였다. 억제 기능의 평가를 위해 생존가능한 CD4+GFP+(WT Tregs) 또는 CD4+m스트로베리(스컬피 Treg)를 분류하였다. Tresp 세포(WT B6 CD4+ 세포)를 5μM 세포 추적 바이올렛 증식 염료(써모 피셔(Thermo Fisher))를 이용하여 20분 동안 37℃에서 표지화하고, 세척한 다음, 사이토카인 없이 R10에서 1:1의 비율로 분류된 Treg와 함께 공동배양하였다. 실험은 96 웰 U 바닥 플레이트의 2.5E4 내지 5E4개 Tresp 세포/웰의 범위였다. 마우스 CD3/CD28 T 활성화 다이나비즈(Activator Dynabeads)(써모피셔)를 1개 비드:1개 Tresp 세포의 비율로 배양물에 첨가하였다. 세포를 3일 동안 배양한 다음, 증식 염료의 희석에 대한 FACS 분석을 수행하였다. 플로우조(FlowJo) V7.6.5(트리스타(TreeStar))를 사용하여 증식 지수를 계산하였다.

[0195] **보정한 Treg를 이용한 스컬피 신생아의 구제 및 분석**

[0196] 29 게이지 인슐린 시린지를 사용하여 50㎕의 PBS 중 정제된 CD4+ 세포를 스컬피 신생아에게 복강내 주사하였다. 각각의 집단의 CD4 세포의 절대 수 및 상대적인 Treg 함량이 도 16에 열거되어 있다. 혈청 분리기 튜브(램 사이언티픽(RAM Scientific))으로 하악 천자에 의해 21일령 스컬피 마우스로부터 혈액을 수집하였고, 500×g에서 10분 동안 원심분리하여 사이토카인 분석을 위한 혈장을 수득하였다. 루미넥스(Luminex) 플랫폼을 사용하여 UCLA 면역 평가 코어(Immune Assessment Core)에 의해 사이토카인을 분석하였다.

[0197] **인간화 이종이식**

[0198] UCLA 의료 센터에서 자연분만 및 제왕절개술 후 제대 CB를 수득하였다. 수득한 모든 표본은 IRB 검토에서 제외된 익명의 의료 폐기물로 간주하였다. 수집 후 48시간 내에 피콜-파크 플러스(Ficoll-Paque PLUS)(GE 헬스케어(GE Healthcare)) 밀도 원심분리를 사용하여 MNC를 단리한 다음, 제조자의 지시(밀테니 바이오텍)에 따라 CD34 농축을 수행하였다. 단일 제대혈 유래의 CD34+ 세포를 저온 유리병에서 90% FBS(깁코)/10% DMSO(시그마 알드리치) 중에서 동결시키고 나중에 사용하기 위해 보관하였다. 해동시, 인간 형질도입 배지(X-비보(vivo)-15[론자(Lonza)], 1× PSG[제미니 바이오 프로덕츠], 50 ng/㎖ SCF, 50 ng/㎖ TPO, 50 ng/㎖ Flt3L[페프로테크] 중에 CD34+ 세포를 재현탁하였다. 세포를 형질도입 매질 중에서 24시간 동안 배양한 다음, LV와 함께 추가 24시간 동안 인큐베이션하였다. 형질도입 후, CD34+ 세포를 수집하고, PBS 중에서 세척한 다음, OKT3(톤보 바이오사이언시스, 1 ㎍/100㎕)과 함께 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션시켜 GVHD가 CD34+ 이식편에 존재하는 T 세포를 오염시키는 것을 방지하였다(Wunderlich *et al.* 2014). 이식 직전에, 137Cs 공급원에 의한 125 Rad의 선량 및 100 rad/분의 선량 비율로 1 내지 3일령의 신생아 NSG 마우스를 조사하였다. 각각의 마우스는 1 내지 3×10^5 CD34+ 세포를 받았다.

[0199] **유세포분석**

[0200] 상기 기재한 바와 같이 대퇴골을 분쇄함으로써 BM으로부터 단일 세포 현탁액을 수득하였다. 70 uM 스트레이너를 통해 조직을 분쇄함으로써 흉선 및 비장을 준비하였다. 다음 방법을 사용하여 유세포분석을 위해 샘플을 제조하였다: 50㎕의 FACS 완충액(인산완충생리식염수[PBS, 코닝(Corning)]/0.5% 소혈청알부민[BSA, 시그마(Sigma)]) 중에 세포를 재현탁시키고, 1㎕의 각각의 항체 및 0.5㎕의 고스트 780 생존도 염료(톤보 바이오사이언시스)와 함께 20 내지 30분 동안 4℃에서 인큐베이션시켰다.

[0201] 모든 항체는 BD 바이오사이언시스로부터 구입하였다. 인간 세포의 분석을 위하여 다음 항체를 사용하였다: CD45-APC, CD45-FITC, CD33-BV421, CD19-PE-Cy7, CD34-FITC, CD34-PE-Cy7, CD4-FITC, CD4-PE-Cy7, CD8-APC, CD25-V450, CD25-PerCPCy5.5. 뮤린 세포의 분석을 위하여 다음 항체를 사용하였다: CD45.1-FITC, CD45.1-V450, CD45.1-APC, CD45.2-FITC, CD45.2-V450, CD4-PECy7, CD4-APC, CD8-PE-Cy7, Gr1-APC, B220-PerCp, CD3-PerCp, cKit-APC, CD44-PerCpCy5.5, CD62L-PE-Cy7, GITR-APC, CD25-APC, CTLA4-APC.

[0202] 세포내 FoxP3 염색을 위하여, 세포를 먼저 상기 기재한 바와 같이 세포 표면 마커 및 고정성 생존도 염료로 염색하였다. 세척 후, FoxP3 염색 완충액 세트(이바이오사이언스(eBioscience))를 사용하여 제조자의 지시에 따라 세포를 고정시키고 투과화시켰다. 인간 FoxP3-PE 또는 인간 FoxP3-APC(이바이오사이언스, 클론 236A/E7)를 30 내지 60분 동안 RT에서 첨가하였다. 아이소타입 대조군을 사용하여 FoxP3+ 게이트를 설정하였다. LSRII 또는 LSR-포르테사(Fortessa) 유세포분석기(BD 바이오사이언시스) 상에서 샘플을 획득하였다. 플로우조 V10(트리스타)을 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0203] **메틸화 분석/중아황산염 시퀀싱**

[0204] 퓨어링크 게놈 DNA 미니 키트(인비트로겐)를 사용하여 분류한 Treg(CD4+CD25+) 및 Tconv(CD4+CD25-) 서브세트로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 인간 FoxP3 유전자의 CNS2의 CpG 다이뉴클레오타이드 메틸화 분석을 에피겐디엑스(EpigenDx)에 의해 수행하고, RN아제(RNase)-처리 게놈 DNA의 중아황산염 처리를 한 다음, PCR 증폭 및 파이로시퀀싱(에피겐디엑스 분석 ADS783-FS2)에 의해 결정하였다. 바이러스 CNS2를 고유하게 인식하는 다음 프라이머를 사용하여 통합된 LV DNA로부터 FoxP3 CNS2의 메틸화 분석을 위해 에피겐디엑스에 의해 주문 분석을 수행을 수행하였다: FoxP3 CNS2 바이러스 정방향 프라이머: TGGAGTTAGATTGTTTGGGA(서열번호 11); FoxP3 CNS2 바이러스 역방향 프라이머: CACCTATAAATCCAAATACCCCAC(서열번호 12).

[0205] **실시예 2에 대한 참고문헌**

Baldwin, Kismet, Fabrizia Urbinati, Zulema Romero, Beatriz Campo-Fernandez, Michael L Kaufman, Aaron R Cooper, Katelyn Masiuk, Roger P Hollis, and Donald B Kohn. 2015. "Enrichment of Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Facilitates Transduction for Stem Cell Gene Therapy." *Stem Cells* 33(5): 1532-1542.

Barzaghi, Federica, Laura Cristina Amaya Hernandez, Benedicte Neven, Silvia Ricci, Zeynep Yesim Kucuk, Jack J Bleesing, Zohreh Nademi, *et al.* 2018. "Long-Term Follow-up of IPEX Syndrome Patients after Different Therapeutic Strategies: An International Multicenter Retrospective Study." *J. Allegery Clin. Immunol.*, 141(3): 1036-1049.

Bennett, Craig L., Jacinda Christie, Fred Ramsdell, Mary E. Brunkow, Polly J. Ferguson, Luke Whitesell, Thaddeus E. Kelly, Frank T. Saulsbury, Phillip F. Chance, and Hans D. Ochs. 2001. "The Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome (IPEX) Is Caused by Mutations of FOXP3." *Nat. Genet.* 27(1): 20-21.

[Billerbeck, Eva, Walter T Barry, Kathy Mu, Marcus Dorner, Charles M Rice, and Alexander Ploss. 2011. "Development of Human CD4+FoxP3+ Regulatory T Cells in Human Stem Cell Factor-, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-, and Interleukin-3-Expressing NOD-SCID IL2Rγ(Null) Humanized Mice." *Blood* 117(11): 3076-3086.

Canté-Barrett, Kirsten, Rui D. Mendes, Willem K. Smits, Yvette M. van Helsdingen-van Wijk, Rob Pieters, and Jules P. P. Meijerink. 2016. "Lentiviral Gene Transfer into Human and Murine Hematopoietic Stem Cells: Size Matters." BMC Research Notes 9(1): 312.

[0206]

Cavazzana-Calvo, Marina, Emmanuel Payen, Olivier Negre, Gary Wang, Kathleen Hehir, Floriane Fusil, Julian Down, *et al.* 2010. "Transfusion Independence and HMGA2 Activation after Gene Therapy of Human β-Thalassaemia." *Nature* 467(7313): 318-322.

Chen, WanJun, Wenwen Jin, Neil Hardegen, Ke-Jian Lei, Li Li, Nancy Marinos, George McGrady, and Sharon M Wahl. 2003. "Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF-Beta Induction of Transcription Factor Foxp3." *J. Exp. Med.* 198(12): 1875-1886.

Cooper, Aaron R, Sanjeet Patel, Shantha Senadheera, Kathrin Plath, Donald B Kohn, and Roger P Hollis. 2011. "Highly Efficient Large-Scale Lentiviral Vector Concentration by Tandem Tangential Flow Filtration." *J. Virol. Meth.* 177(1): 1-9.

Curotto de Lafaille, Maria A, Andreia C Lino, Nino Kutchukhidze, and Juan J Lafaille. 2004. "CD25- T Cells Generate CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells by Peripheral Expansion." *J. Immunol.* 173(12): 7259-7268.

Dull, T, R Zufferey, M Kelly, R J Mandel, M Nguyen, D Trono, and L Naldini. 1998. "A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System." *J. Virol.* 72(11): 8463-8471.

Fontenot, Jason D., Marc A. Gavin, and Alexander Y. Rudensky. 2003. "Foxp3 Programs the Development and Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells." *Nat. Immunol.* 4(4): 330-336.

Guo, Huifang, Ming Zheng, Kui Zhang, Fengfan Yang, Xin Zhang, Qing Han, Zhi-Nan Chen, and Ping Zhu. 2016. "Functional Defects in CD4+ CD25high FoxP3+ Regulatory Cells in Ankylosing Spondylitis." *Sci. Rep.* 6(1): 37559.

Haertle, T, CJ Carrera, DB Wasson, and LC Sowers. 1988. "Metabolism and Anti-Human Immunodeficiency Virus-1 Activity of 2-Halo-2', 3'-Dideoxyadenosine Derivatives." *J. Biol. Chem.* 263: 5870-5875.

Harada, S, Y Koyanagi, and N Yamamoto. 1985. "Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-Carrying Cells MT-2 and MT-4 and Application in a Plaque Assay." *Science,* 229(4713): 563-566.

[0207]

Haribhai, Dipica, Jason B Williams, Shuang Jia, Derek Nickerson, Erica G Schmitt, Brandon Edwards, Jennifer Ziegelbauer, *et al*. 2011. "A Requisite Role for Induced Regulatory T Cells in Tolerance Based on Expanding Antigen Receptor Diversity." *Immunity,* 35(1): 109-122.

Kasow, Kimberly A., Vanessa M. Morales-Tirado, David Wichlan, Sheila A. Shurtleff, Allistair Abraham, Derek A. Persons, and Janice M. Riberdy. 2011. "Therapeutic *in vivo* Selection of Thymic-Derived Natural T Regulatory Cells Following Non-Myeloablative Hematopoietic Stem Cell Transplant for IPEX." *Clin. Immunol.* 141(2): 169-176.

Khattri, R, D Kasprowicz, T Cox, M Mortrud, M W Appleby, M E Brunkow, S F Ziegler, and F Ramsdell. 2001. "The Amount of Scurfin Protein Determines Peripheral T Cell Number and Responsiveness." *J. Immunol.* 167(11): 6312-6320.

Kumar, Mukesh, Brian Keller, Ndeye Makalou, and Richard E. Sutton. 2001. "Systematic Determination of the Packaging Limit of Lentiviral Vectors." *Hum. Gene Ther.* 12(15): 1893-1905.

Li, Xudong, Yuqiong Liang, Mathias LeBlanc, Chris Benner, and Ye Zheng. 2014a. "Function of a Foxp3 Cis-Element in Protecting Regulatory T Cell Identity." *Cell*, 158(4): 734-748.

Liu, Mingdong, Matthew T Maurano, Hao Wang, Heyuan Qi, Chao-Zhong Song, Patrick A Navas, David W Emery, John A Stamatoyannopoulos, and George Stamatoyannopoulos. 2015. "Genomic Discovery of Potent Chromatin Insulators for Human Gene Therapy." *Nat. Biotechnol.* 33(2): 198-203.

Logan, Aaron C, Sarah J Nightingale, Dennis L Haas, Gerald J Cho, Karen A Pepper, and Donald B Kohn. 2004. "Factors Influencing the Titer and Infectivity of Lentiviral Vectors." *Hum. Gene Ther.* 15: 976-988.

Morgan, Richard A, David Gray, Anastasia Lomova, and Donald B Kohn. 2017. "Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: Progress and Lessons Learned." *Cell Stem Cell*, 21(5): 574-590.

Passerini, Laura, Eva Rossi Mel, Claudia Sartirana, Georgia Fousteri, Attilio Bondanza, Luigi Naldini, Maria Grazia Roncarolo, and Rosa Bacchetta. 2013. "CD4+ T Cells from IPEX Patients Convert into Functional and Stable Regulatory T Cells by FOXP3 Gene Transfer." *Sci. Transl. Med.* 5(215): 215ra174.

[0208]

Riley, James L., Carl H. June, and Bruce R. Blazar. 2009. "Human T Regulatory Cell Therapy: Take a Billion or So and Call Me in the Morning." *Immunol.* 30(5): 656-665.

Safinia, Niloufar, Pervinder Sagoo, Robert Lechler, and Giovanna Lombardi. 2010. "Adoptive Regulatory T Cell Therapy: Challenges in Clinical Transplantation." *Curr. Opin. Organ Transpl.* 15(4): 427-434.

Santoni de Sio, F. R., L. Passerini, M. M. Valente, F. Russo, L. Naldini, M. G. Roncarolo, and R. Bacchetta. 2017. "Ectopic FOXP3 Expression Preserves Primitive Features Of Human Hematopoietic Stem Cells While Impairing Functional T Cell Differentiation." *Sci. Rep.* 7(1): 15820.

Seidel, Markus G, Gerhard Fritsch, Thomas Lion, Birgit Jürgens, Andreas Heitger, Rosa Bacchetta, Anita Lawitschka, *et al.* 2009. "Selective Engraftment of Donor CD4+25high FOXP3-Positive T Cells in IPEX Syndrome after Nonmyeloablative Hematopoietic Stem Cell Transplantation." *Blood,* 113(22): 5689-5691.

Tai, Xuguang, Batu Erman, Amala Alag, Jie Mu, Motoko Kimura, Gil Katz, Terry Guinter, *et al.* 2013. "Foxp3 Transcription Factor Is Proapoptotic and Lethal to Developing Regulatory T Cells Unless Counterbalanced by Cytokine Survival Signals." *Immunity,* 38(6): 1116-1128.

Toker, Aras, Dirk Engelbert, Garima Garg, Julia K Polansky, Stefan Floess, Takahisa Miyao, Udo Baron, *et al.* 2013. "Active Demethylation of the Foxp3 Locus Leads to the Generation of Stable Regulatory T Cells within the Thymus." *J. Immunol.* 190(7): 3180-3188.

Wildin, Robert S., Fred Ramsdell, Jane Peake, Francesca Faravelli, Jean-Laurent Casanova, Neil Buist, Ephrat Levy-Lahad, *et al.* 2001a. "X-Linked Neonatal Diabetes Mellitus, Enteropathy and Endocrinopathy Syndrome Is the Human Equivalent of Mouse Scurfy." *Nat. Genet.* 27(1): 18-20.

Wunderlich, Mark, Ryan A Brooks, Rushi Panchal, Garrett W Rhyasen, Gwenn Danet-Desnoyers, and James C Mulloy. 2014. "OKT3 Prevents Xenogeneic GVHD and Allows Reliable Xenograft Initiation from Unfractionated Human Hematopoietic Tissues." *Blood,* 123(24): e134-144.

[0209]

Yue, Xiaojing, Sara Trifari, Tarmo Äijö, Ageliki Tsagaratou, William A Pastor, Jorge A Zepeda-Martínez, Chan-Wang J Lio, *et al.* 2016. "Control of Foxp3 Stability through Modulation of TET Activity." *J. Exp. Med.* 213(3): 377-397.

Zheng, Ye, Steven Josefowicz, Ashutosh Chaudhry, Xiao P. Peng, Katherine Forbush, and Alexander Y. Rudensky. 2010. "Role of Conserved Non-Coding DNA Elements in the Foxp3 Gene in Regulatory T-Cell Fate." *Nature,* 463(7282): 808-812.

[0210]

[0211] 본 명세서에 기재된 실시예 및 실시형태는 단지 예시적인 목적을 위한 것이며, 이를 고려하여 다양한 변형 또는 변경이 당업자에게 제안될 것이고 본 출원의 사상 및 범위 및 첨부된 청구범위의 범주에 포함되어야 함이 이해된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 본 명세서에 전문이 참조로 포함된다.

[0212] 서열목록

서열번호 1.

pCCL-CNSp-FOXP3-3UTR-A2. 접합 마커로부터의 서열:

CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACA
TTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAA
AGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTT
GCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTT
GGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT
CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTAT
TATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA
CTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAA
TTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGA
TCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCT
TGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG
CCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTT
CCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTC
GGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGC
GGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGA
CGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACT
GATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAA
CTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAA
TCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATC
TTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTA
CCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCT
TCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTT
CAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCT
GCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG
CGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTA
CACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA
AAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTC
CAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCG
TCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCC
TTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCC
CTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCG
AACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCG
CCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGA
AAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGC
TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCAC
ACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAAC
AAAAGCTGGAGCTGCAAGCTTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACAT
TTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAA
TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAC
TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAAT
GACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTAT
TTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTA
TTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGA
CTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTT
TGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACC

[0213]

[0214]

CCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCG
TAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATA
AGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCT
CTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAA
GTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGT
CAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAAAGCGAAAGGGAAACCA
GAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGC
GGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTG
CGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGG
CCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAAC
GATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACA
GCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCA
ACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGA
TAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAGAC
CTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAA
AATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAA
AGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGG
GCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCA
GCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGG
GGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGC
TCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGC
TAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAG
AGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAA
GAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTA
ACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGG
TTTAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCA
TTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAG
AAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTA
TCGATCTCGACACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGG
GGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATT
ACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCA
GTTTGGGTCGAGGATATCTAGGTTAGTCTTTTTTTTCTGTGGCTTCTGTCTCTGGTTTTGTG
CTTAGAAAGTCCTTTCCTACTTGAAAATGAGATAAATGTTCACCTATGTTGGCTTCTAGTC
TCTTTTATGGCTTCATTTTTTCCATTTACTATAGAGGTTAAGAGTGTGGGTACTGGAGCCA
GACTGTCTGGGACAAACCCAGCGTCACCCCAAGCCCTATGTGTGATTTTTAGCCAGGCACT
TAACCTCTCCATCCAAGAAGGGCCAGGTCTTCAGAGCTAGGGGCTTGTCATAGTGGCCAGA
TGGACATCACCTACCACATCCACCAGCACCCATGTCACCCCACCTGGGCCAAGCCTGCTGC
AGGACAGGGCAGCCAGTTCTCGGAACGAAACCTGTGGGGTGGGGTATCTGCCCTCTTCTCT
TCCTCCGTGGTGTCGATGAAGCCCGGCGCATCCGGCCGCCATGACGTCAATGGCGGAAAAA
TCTGGGCAAGTCGGGGGCTGTGACAACAGGGCCCAGATGCAGACCCCGATATGAAAACATA
ATCTGTGTCCCAGAAACATCCCCCATTCAGCTTCTGAGAAACCCAGTCAGAAAGGGACGTC
CCAACAGAGGCCCTGGGCCCAGGATGGGGCAGGCAGGGTGGGGTACCTGGACCTACAGGTG
CCGACCTTTACTGTGGCACTGGGCGGGAGGGGGGCTGGCTGGGGCACAGGAAGTGGTTTCT
GGGTCCCAGGCAAGTCTGTGACTTATGCAGATGTTGCAGGGCCAAGAAAATCCCCACCTGC
CAGGCCTCAGAGATTGGAGGCTCTCCCCGACCTCCCAATCCTCCCATCCACACATAGAGCT
TCAGATTCTCTTTCTTTCCCCAGAGACCCTCAAATATCCTCTCACTCACAGAATGGTGTCT
CTGCCTGCCTCGGGTTGGCCCTGTGATTTATTTTAGTTCTTTTCCCTTGTTTTTTTTTTTT
CAAACTCTATACACTTTTGTTTTAAAAACTGTGGTTTCTCATGAGCCCTATTATCTCATTG
ATACCTCTCACCTCTGTGGTGAGGGGAAGAAATCATATTTTCAGATGACTCGTAAAGGGCA
AAGAAAAAAACCCAAAATTTCAAAATTTCCGTTTAAGTCTCATAATCAAGAAAAGGAGAAA
CACAGAGAGAGAGAAAAAAAAAACTATGAGAACCCCTCCCCACCCCGTGATTATCAGCGCA
CACACTCATCGAAAAAAATTTGGATTATTAGAAGAGAGAGGTCTGCGGCTTCCACACCGTA

[0215]

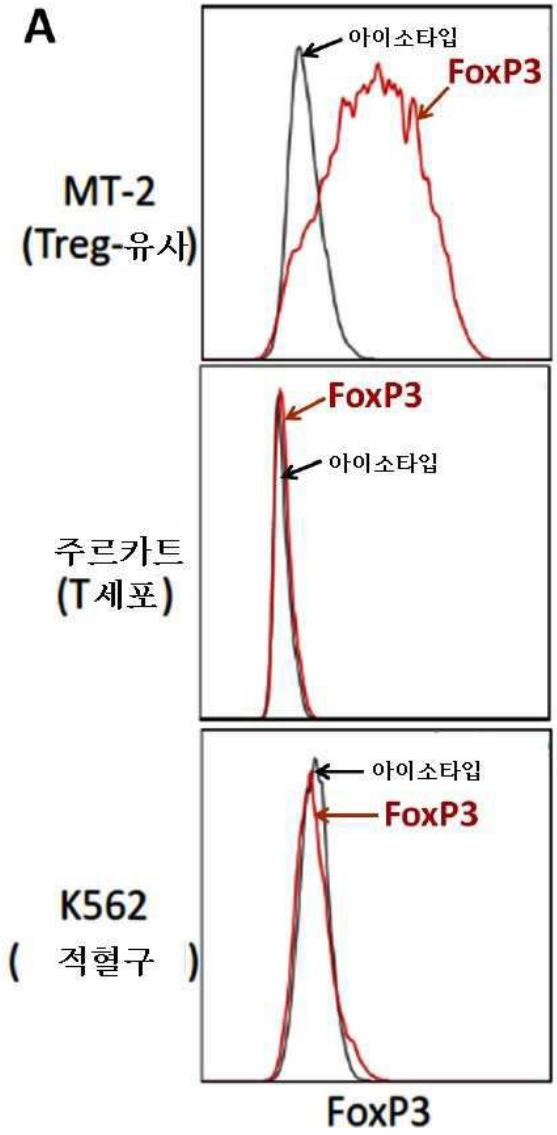
```
CAGCGTGGTTTTTCTTCTCGGTATAAAAGCAAAGTTGTTTTTGATACGTGACAGTTTCCCA
CAAGCCAGGCTGATCCTTTTCTGTCAGTCCACTTCACCAAGCCTGCCCTTGGACAAGGACC
CGATGCCCAACCCCAGGCCTGGCAAGCCCTCGGCCCCTTCCTTGGCCCTTGGCCCATCCCC
AGGAGCCTCGCCCAGCTGGAGGGCTGCACCCAAAGCCTCAGACCTGCTGGGGGCCCGGGGC
CCAGGGGGAACCTTCCAGGGCCGAGATCTTCGAGGCGGGGCCCATGCCTCCTCTTCTTCCT
TGAACCCCATGCCACCATCGCAGCTGCAGCTGCCCACACTGCCCCTAGTCATGGTGGCACC
CTCCGGGGCACGGCTGGGCCCCTTGCCCCACTTACAGGCACTCCTCCAGGACAGGCCACAT
TTCATGCACCAGCTCTCAACGGTGGATGCCCACGCCCGGACCCCTGTGCTGCAGGTGCACC
CCCTGGAGAGCCCAGCCATGATCAGCCTCACACCACCCACCACCGCCACTGGGGTCTTCTC
CCTCAAGGCCCGGCCTGGCCTCCCACCTGGGATCAACGTGGCCAGCCTGGAATGGGTGTCC
AGGGAGCCGGCACTGCTCTGCACCTTCCCAAATCCCAGTGCACCCAGGAAGGACAGCACCC
TTTCGGCTGTGCCCCAGAGCTCCTACCCACTGCTGGCAAATGGTGTCTGCAAGTGGCCCGG
ATGTGAGAAGGTCTTCGAAGAGCCAGAGGACTTCCTCAAGCACTGCCAGGCGGACCATCTT
CTGGATGAGAAGGGCAGGGCACAATGTCTCCTCCAGAGAGAGATGGTACAGTCTCTGGAGC
AGCAGCTGGTGCTGGAGAAGGAGAAGCTGAGTGCCATGCAGGCCCACCTGGCTGGGAAAAT
GGCACTGACCAAGGCTTCATCTGTGGCATCATCCGACAAGGGCTCCTGCTGCATCGTAGCT
GCTGGCAGCCAAGGCCCTGTCGTCCCAGCCTGGTCTGGCCCCCGGGAGGCCCCTGACAGCC
TGTTTGCTGTCCGGAGGCACCTGTGGGGTAGCCATGGAAACAGCACATTCCCAGAGTTCCT
CCACAACATGGACTACTTCAAGTTCCACAACATGCGACCCCCTTTCACCTACGCCACGCTC
ATCCGCTGGGCCATCCTGGAGGCTCCAGAGAAGCAGCGGACACTCAATGAGATCTACCACT
GGTTCACACGCATGTTTGCCTTCTTCAGAAACCATCCTGCCACCTGGAAGAACGCCATCCG
CCACAACCTGAGTCTGCACAAGTGCTTTGTGCGGGTGGAGAGCGAGAAGGGGGCTGTGTGG
ACCGTGGATGAGCTGGAGTTCCGCAAGAAACGGAGCCAGAGGCCCAGCAGGTGTTCCAACC
CTACACCTGGCCCCTGATGACCTCAAGATCAAGGAAAGGAGGATGGACGAACAGGGGCCAA
ACTGGTGGGAGGCAGAGGTGGTGGGGGCAGGGATGATAGGCCCTGGATGTGCCCACAGGGA
CCAAGAAGTGAGGTTTCCACTGTCTTGCCTGCCAGGGCCCCTGTTCCCCCGCTGGCAGCCA
CCCCCTCCCCCATCATATCCTTTGCCCCAAGGCTGCTCAGAGGGGCCCCGGTCCTGGCCCC
AGCCCCCACCTCCGCCCCAGACACACCCCCCAGTCGAGCCCTGCAGCCAAACAGAGCCTTC
ACAACCAGCCACACAGAGCCTGCCTCAGCTGCTCGCACAGATTACTTCAGGGCTGGAAAAG
TCACACAGACACACAAAATGTCACAATCCTGTCCCTCACTCAACACAAACCCCAAAACACA
GAGAGCCTGCCTCAGTACACTCAAACAACCTCAAAGCTGCATCATCACACAATCACACACA
AGCACAGCCCTGACAACCCACACACCCCAAGGCACGCACCCACAGCCAGCCTCAGGGCCCA
CAGGGGCACTGTCAACACAGGGGTGTGCCCAGAGGCCTACACAGAAGCAGCGTCAGTACCC
TCAGGATCTGAGGTCCCAACACGTGCTCGCTCACACACACGGCCTGTTAGAATTCACCTGT
GTATCTCACGCATATGCACACGCACAGCCCCCCAGTGGGTCTCTTGAGTCCCGTGCAGACA
CACACAGCCACACACACTGCCTTGCCAAAAATACCCCGTGTCTCCCCTGCCACTCACCTCA
CTCCCATTCCCTGAGCCCTGATCCATGCCTCAGCTTAGACTGCAGAGGAACTACTCATTTA
TTTGGGATCCAAGGCCCCCAACCCACAGTACCGTCCCCGAATTCGAGCTCGGTACCTTTAA
GACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACT
GGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATCAGAGCGAGATTCCGTCTCAAAGAAAA
AAAAAGTAATGAAATGAATAAAATGAGTCCTAGAGCCAGTAAATGTCGTAAATGTCTCAGC
TAGTCAGGTAGTAAAAGGTCTCAACTAGGCAGTGGCAGAGCAGGATTCAAATTCAGGGCTG
TTGTGATGCCTCCGCAGACTCTGAGCGCCACCTGGTGGTAATTTGTCTGTGCCTCTTCTGA
CGTGGAAGAACAGCAACTAACACACTAACACGGCATTTACTATGGGCCAGCCATTGTTGCT
TTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAA
CTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTG
CCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAA
AATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTATTATTCAGTATTTATAACTTGCAAAGAAA
TGAATATCAGAGAGTGAGAGGAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCA
ATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC
AAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAT
CCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTT
```

[0216]

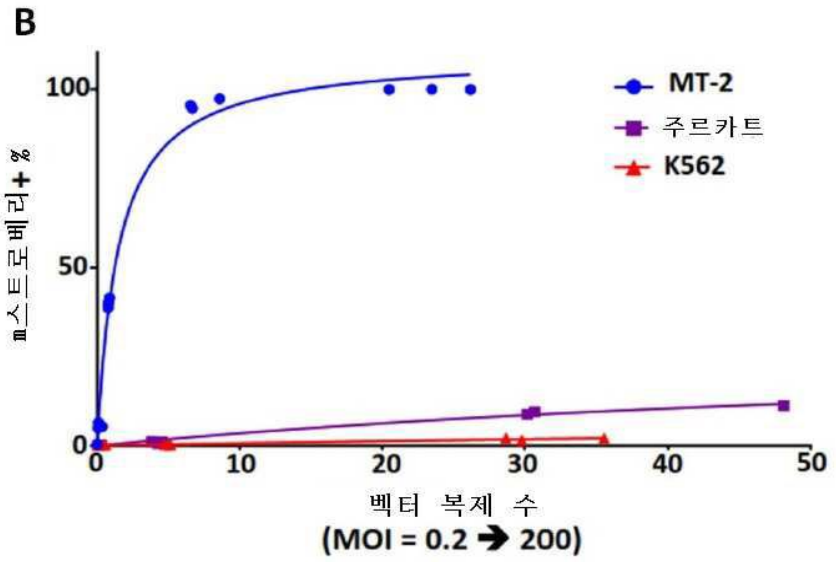
```
ATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCT
TTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCGTCGAGACGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTAT
TACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCC
AACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCG
CACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCGACGCGCCCTGT
AGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA
GCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTT
TCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCAC
CTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGA
CGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAAC
TGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATT
TCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAA
TATTAACGTTTACAATTTCC
```

도면

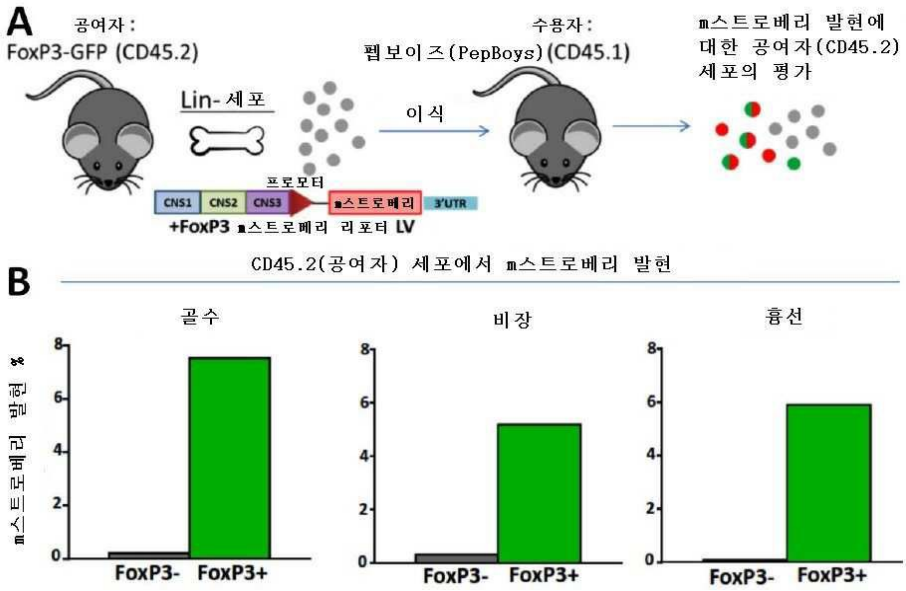
도면1a


A
아이소타입
FoxP3
MT-2
(Treg-유사)
FoxP3
아이소타입
주르카트
(T세포)
아이소타입
FoxP3
K562
(적혈구)
FoxP3

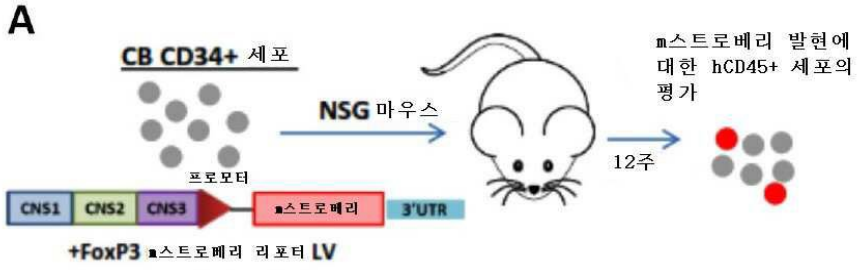
도면1b



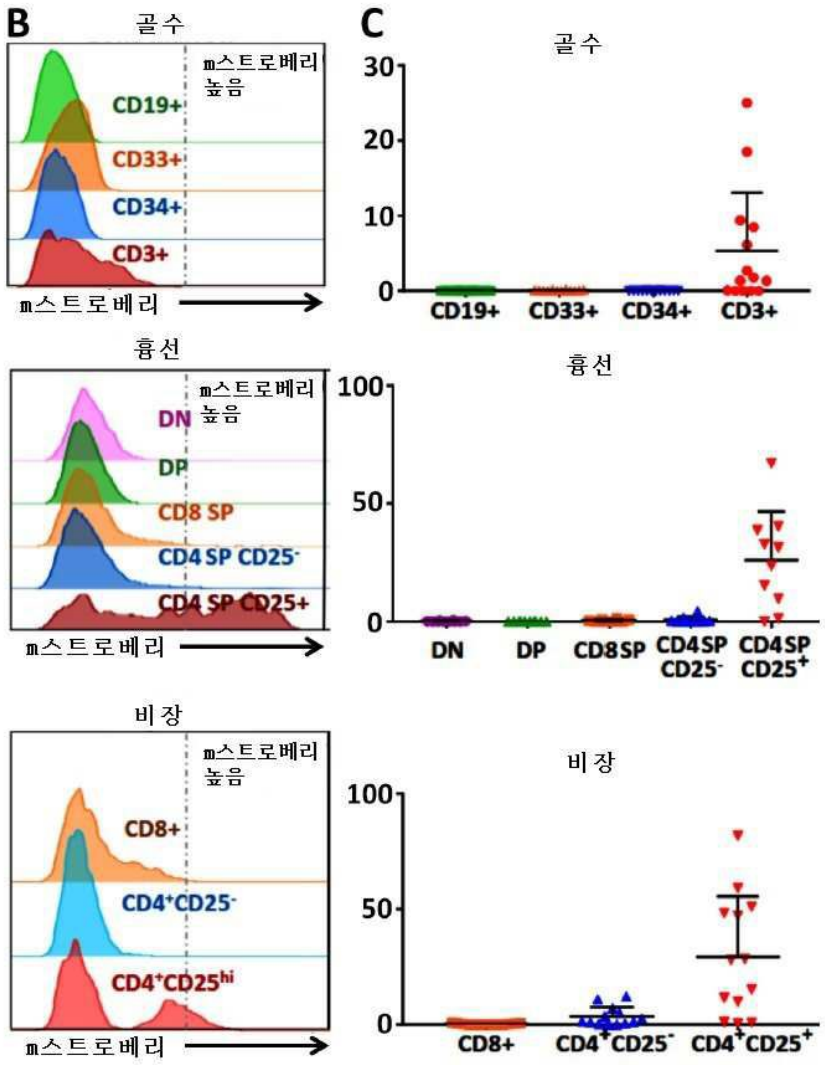
도면2



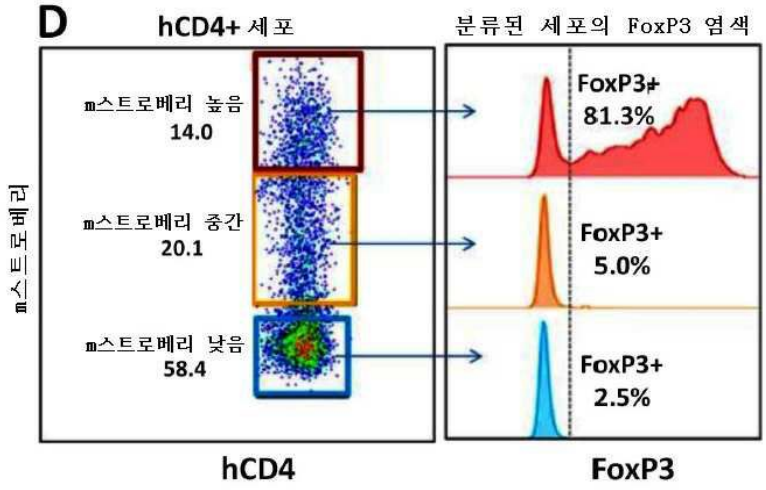
도면3a



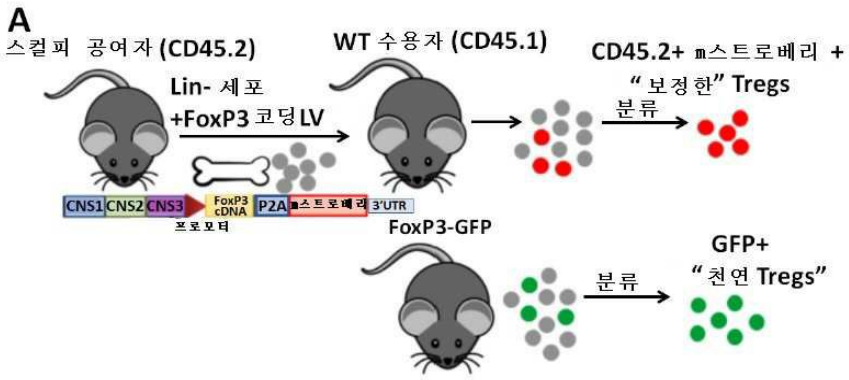
도면3bc


B
골수
m스트로베리 높음
CD19+
CD33+
CD34+
CD3+
m스트로베리
C
골수
30
20
10
0
CD19+
CD33+
CD34+
CD3+
흉선
m스트로베리 높음
DN
DP
CD8 SP
CD4 SP CD25-
CD4 SP CD25+
m스트로베리
흉선
100
50
0
DN
DP
CD8SP
CD4SP CD25-
CD4SP CD25+
비장
m스트로베리 높음
CD8+
CD4+CD25-
CD4+CD25hi
m스트로베리
비장
100
50
0
CD8+
CD4+CD25-
CD4+CD25+

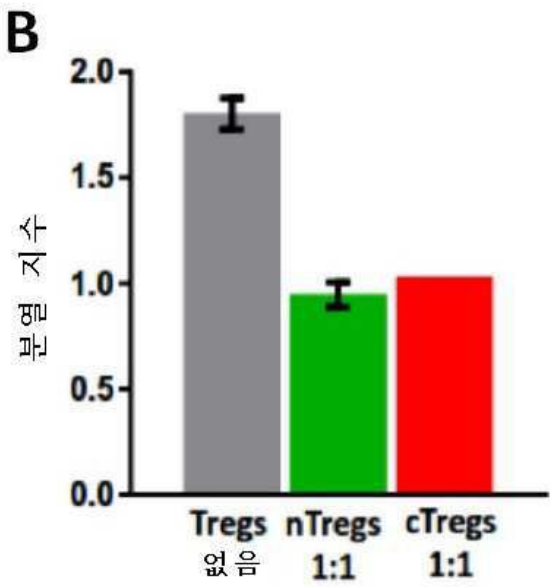
도면3d


D
hCD4+ 세포
분류된 세포의 FoxP3 염색
m스트로베리 높음
14.0
m스트로베리 중간
20.1
m스트로베리 낮음
58.4
m스트로베리
FoxP3+
81.3%
FoxP3+
5.0%
FoxP3+
2.5%
hCD4
FoxP3

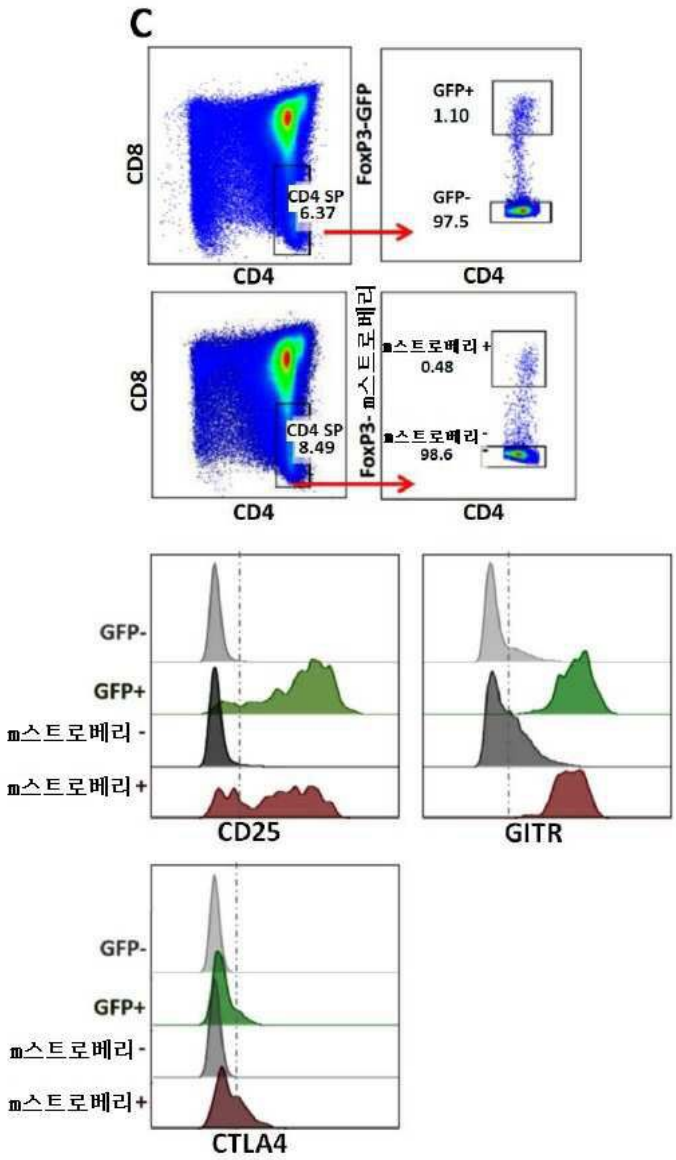
도면4a


A
스컬피 공여자 (CD45.2)
Lin- 세포
+FoxP3 코딩LV
CNS1 CNS2 CNS3
프로모터
FoxP3 cDNA
P2A
3'UTR
WT 수용자 (CD45.1)
CD45.2+ mStrawberry +
"보정한" Tregs
분류
FoxP3-GFP
GFP+
"천연 Tregs"
분류

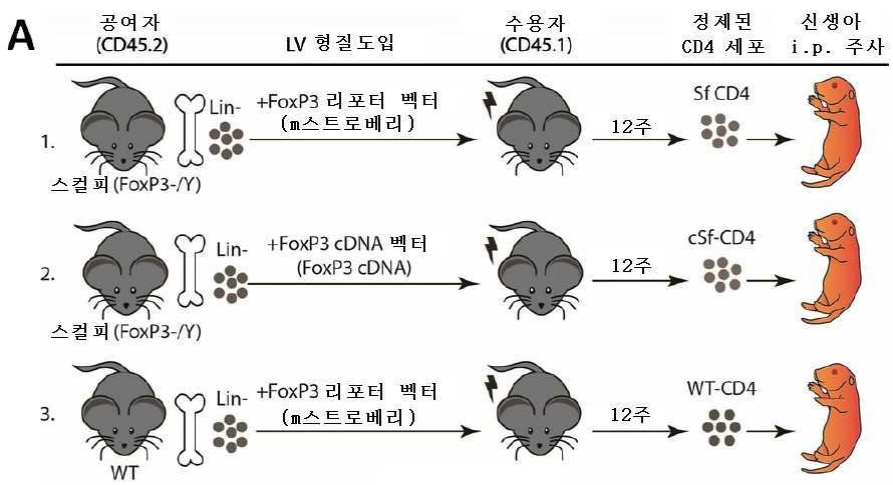
도면4b


B
분열 지수
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Tregs
없음
nTregs
1:1
cTregs
1:1

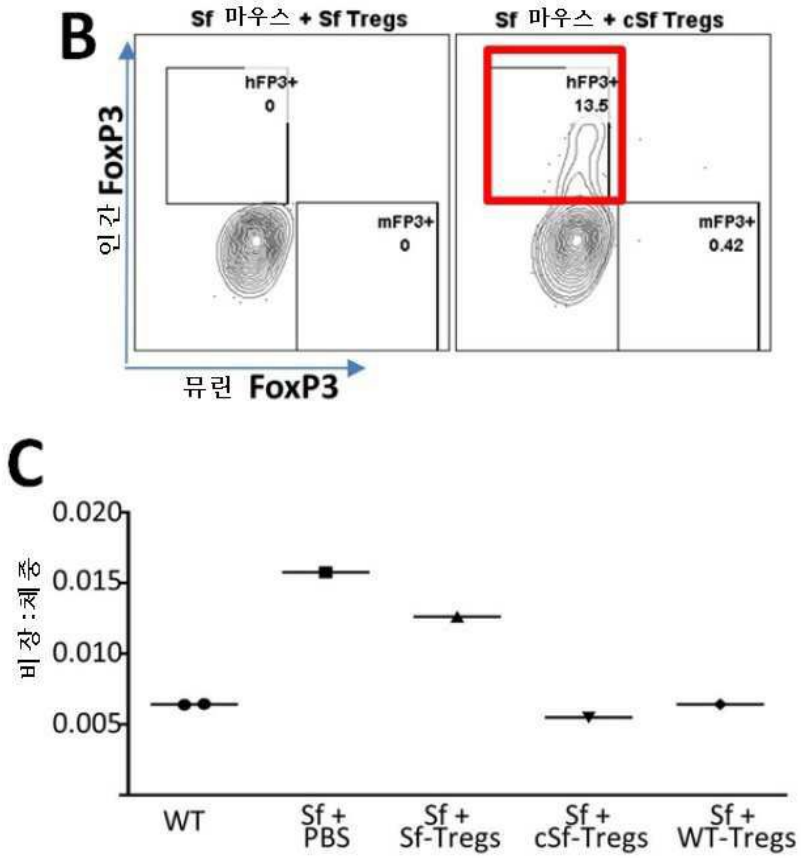
도면4c


C
CD8
CD4 SP
6.37
CD4
FoxP3-GFP
GFP+
1.10
GFP-
97.5
CD4
CD8
CD4 SP
8.49
CD4
FoxP3-ㅁ스트로베리
ㅁ스트로베리+
0.48
ㅁ스트로베리-
98.6
CD4
GFP-
GFP+
ㅁ스트로베리-
ㅁ스트로베리+
CD25
GITR
GFP-
GFP+
ㅁ스트로베리-
ㅁ스트로베리+
CTLA4

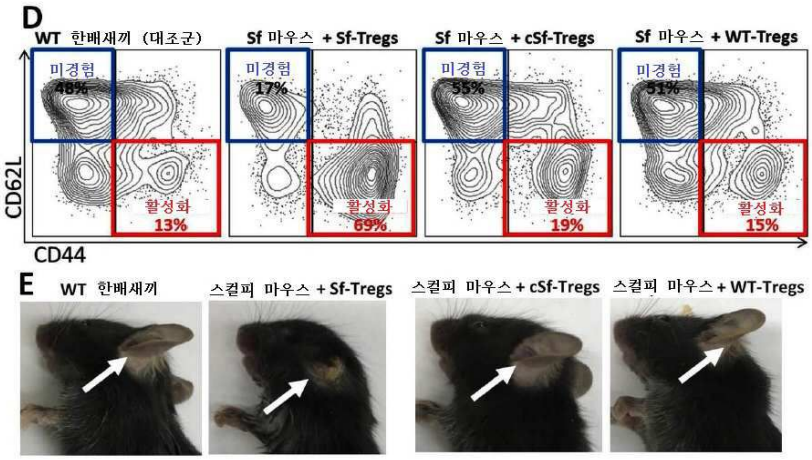
도면5a


A
공여자
(CD45.2)
LV 형질도입
수용자
(CD45.1)
정제된
CD4 세포
신생아
i.p. 주사
1.
스컬피(FoxP3-/Y)
Lin-
+FoxP3 리포터 벡터
(ㅁ스트로베리)
12주
Sf CD4
2.
스컬피(FoxP3-/Y)
Lin-
+FoxP3 cDNA 벡터
(FoxP3 cDNA)
12주
cSf-CD4
3.
WT
Lin-
+FoxP3 리포터 벡터
(ㅁ스트로베리)
12주
WT-CD4

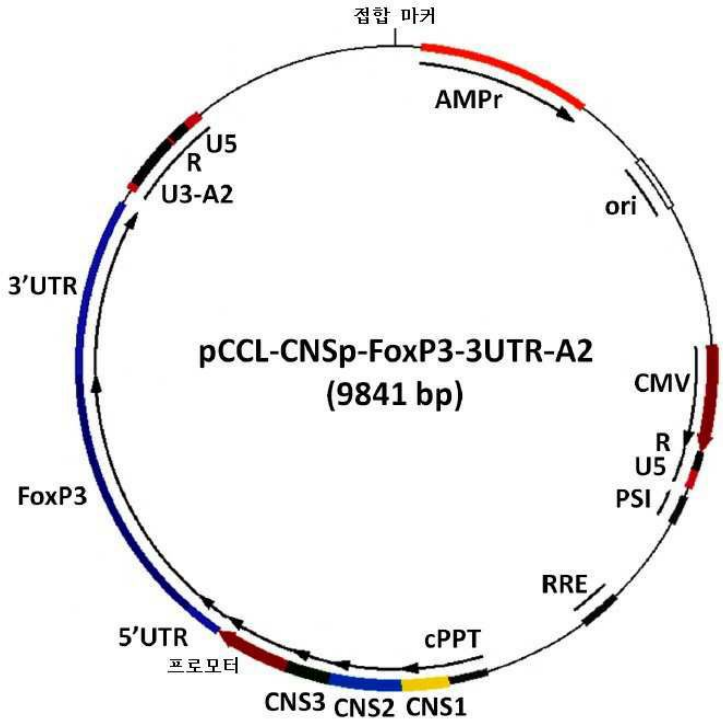
도면5bc


B
Sf 마우스 + Sf Tregs
Sf 마우스 + cSf Tregs
hFP3+
0
mFP3+
0
hFP3+
13.5
mFP3+
0.42
인간 FoxP3
뮤린 FoxP3
C
0.020
0.015
0.010
0.005
비장 : 체중
WT
Sf + PBS
Sf + Sf-Tregs
Sf + cSf-Tregs
Sf + WT-Tregs

도면5de


D
WT 한배새끼 (대조군)
Sf 마우스 + Sf-Tregs
Sf 마우스 + cSf-Tregs
Sf 마우스 + WT-Tregs
미경험
48%
활성화
13%
미경험
17%
활성화
69%
미경험
55%
활성화
19%
미경험
31%
활성화
15%
CD62L
CD44
E
WT 한배새끼
스컬피 마우스 + Sf-Tregs
스컬피 마우스 + cSf-Tregs
스컬피 마우스 + WT-Tregs

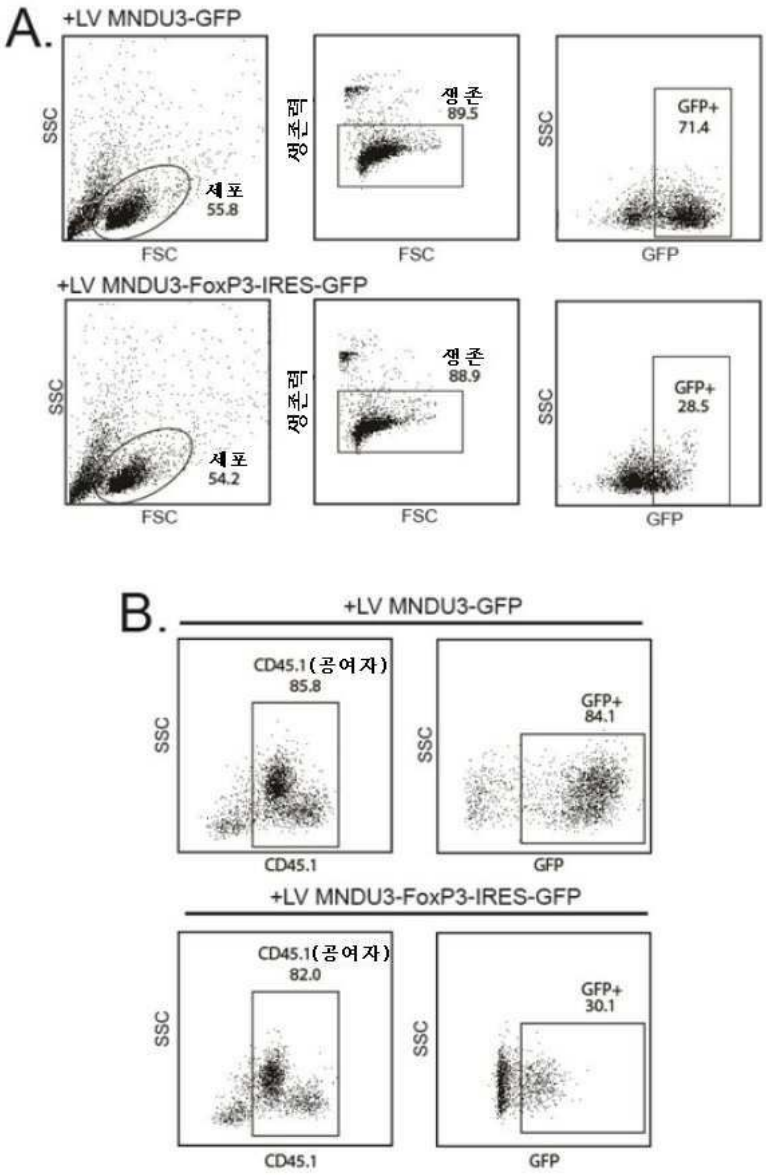
도면6


접합 마커
AMPr
ori
CMV
R
U5
PSI
RRE
cPPT
CNS1
CNS2
CNS3
프로모터
5'UTR
FoxP3
3'UTR
U5
R
U3-A2
pCCL-CNSp-FoxP3-3UTR-A2
(9841 bp)

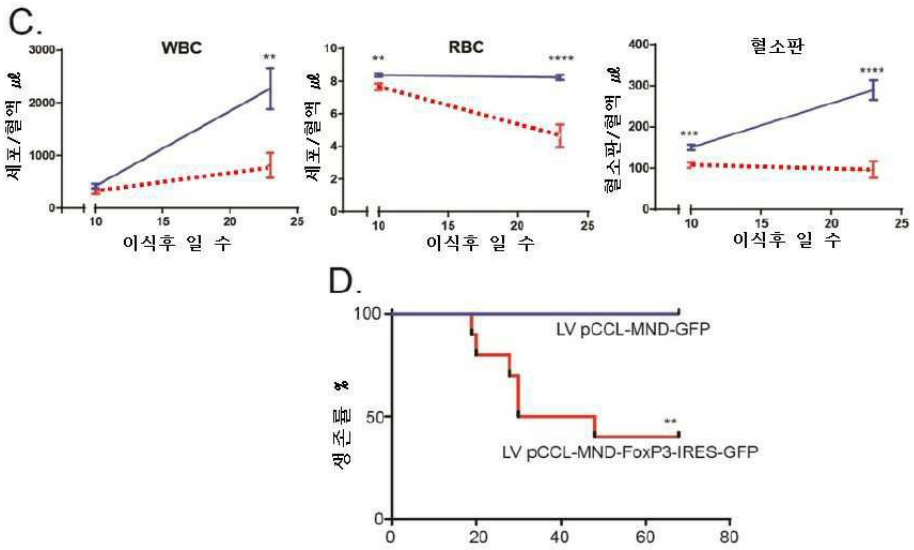
도면7


FoxP3 렌티바이러스 벡터
FoxP3 cDNA 벡터 (6170 bp):
ΔU3
R
U5
A2
Ψ
RRE
cPPT
CNS1
CNS2
CNS3
프로모터
코돈 최적화된 FoxP3 cDNA
FoxP3
3'UTR
ΔU3
R
U5
A2

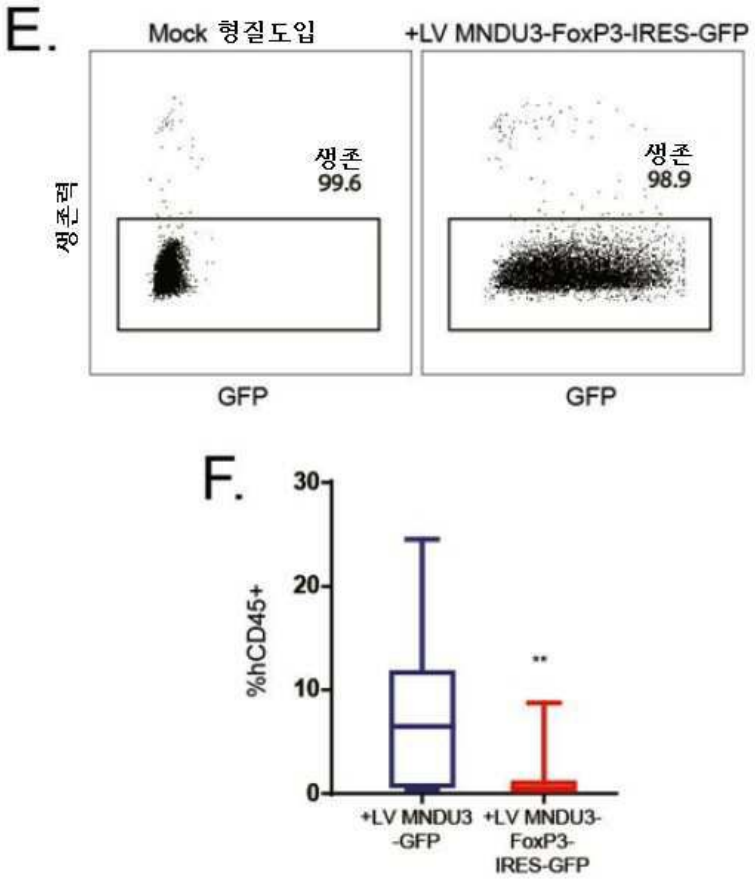
도면8ab


A.
+LV MNDU3-GFP
SSC
세포
55.8
FSC
생존력
생존
89.5
FSC
SSC
GFP+
71.4
GFP
+LV MNDU3-FoxP3-IRES-GFP
SSC
세포
54.2
FSC
생존력
생존
88.9
FSC
SSC
GFP+
28.5
GFP
B.
+LV MNDU3-GFP
SSC
CD45.1(공여자)
85.8
CD45.1
SSC
GFP+
84.1
GFP
+LV MNDU3-FoxP3-IRES-GFP
SSC
CD45.1(공여자)
82.0
CD45.1
SSC
GFP+
30.1
GFP

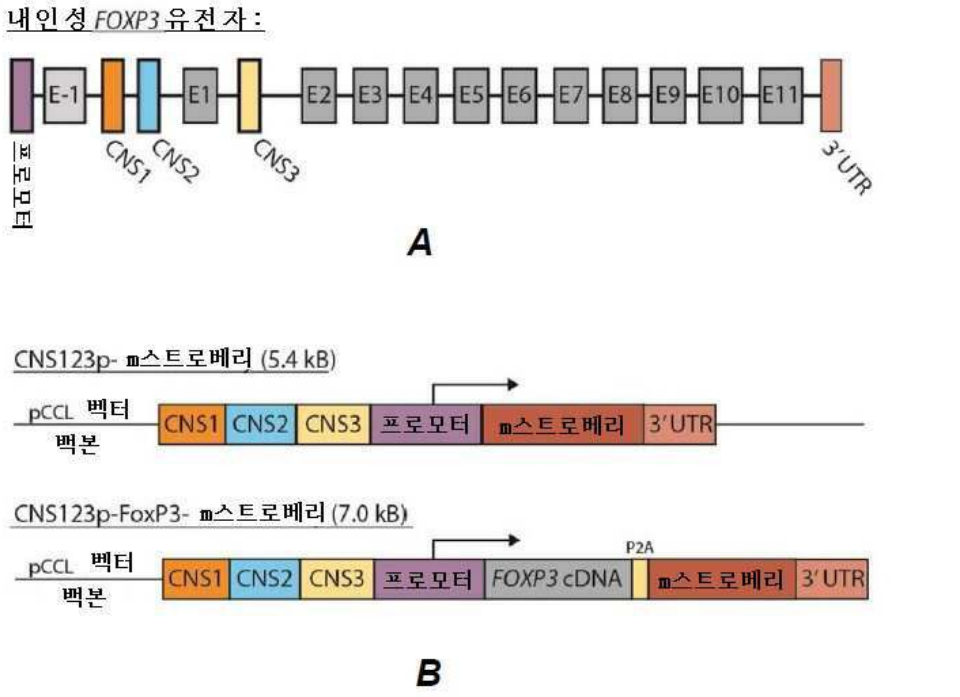
도면8cd


C.
WBC
RBC
혈소판
세포/혈액 μℓ
혈소판/혈액 μℓ
이식후 일 수
D.
LV pCCL-MND-GFP
LV pCCL-MND-FoxP3-IRES-GFP
생존률 %

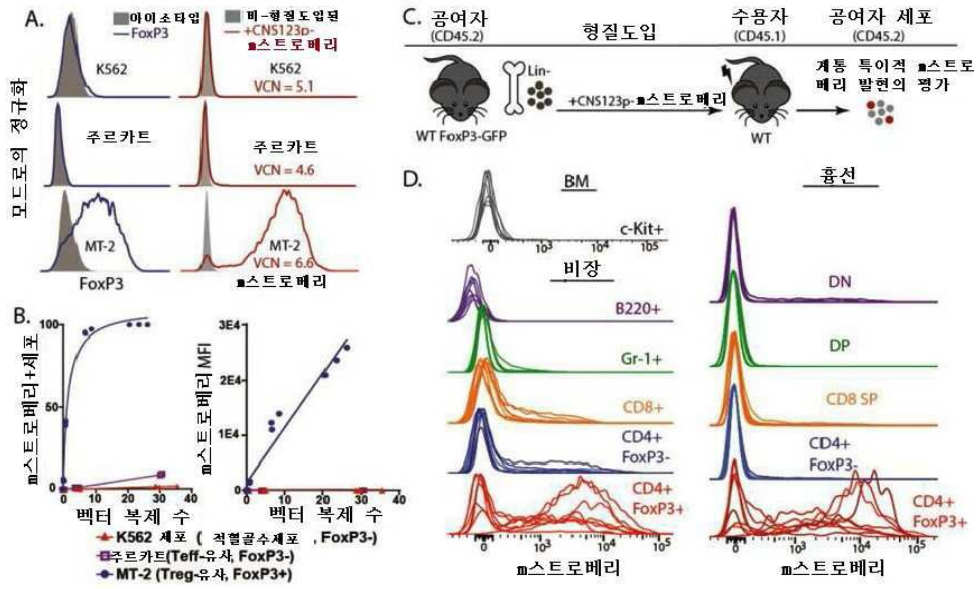
도면8ef


E.
Mock 형질도입
+LV MNDU3-FoxP3-IRES-GFP
생존
99.6
생존
98.9
생존력
GFP
GFP
F.
%hCD45+
+LV MNDU3 -GFP
+LV MNDU3-FoxP3-IRES-GFP

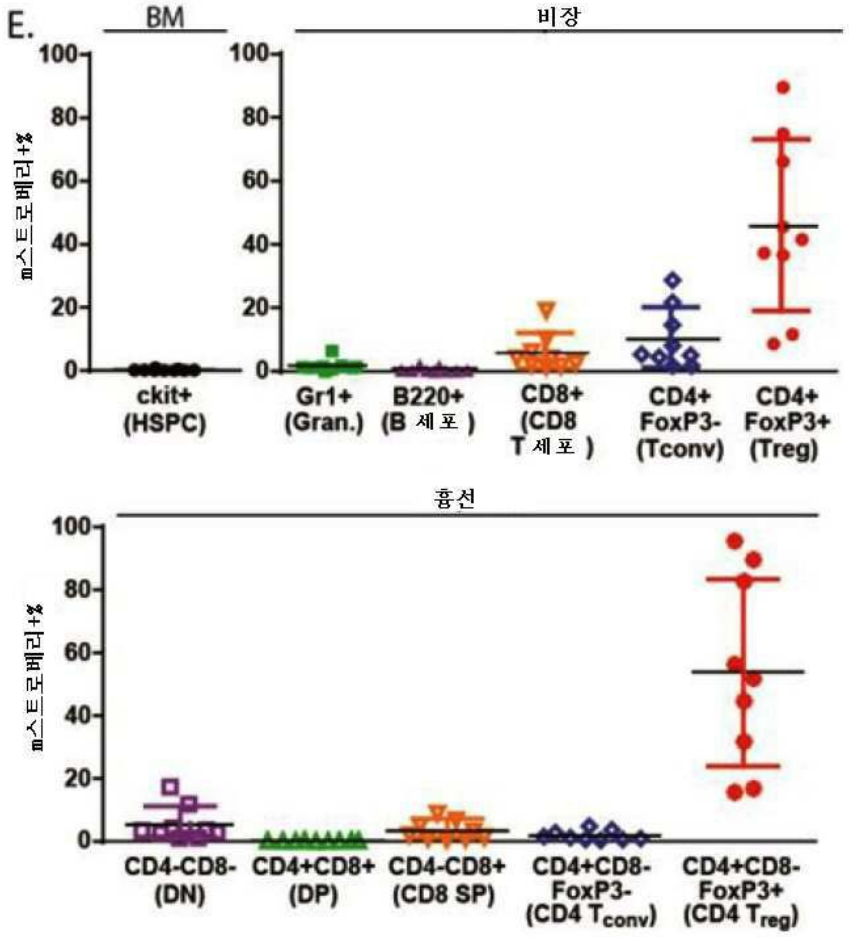
도면9


내인성 FOXP3 유전자 :
E-1
E1
E2
E3
E4
E5
E6
E7
E8
E9
E10
E11
CNS1
CNS2
CNS3
3'UTR
A
CNS123p- ㎷스트로베리 (5.4 kB)
pCCL 벡터 백본
CNS1
CNS2
CNS3
프로모터
㎷스트로베리
3'UTR
CNS123p-FoxP3- ㎷스트로베리 (7.0 kB)
pCCL 벡터 백본
CNS1
CNS2
CNS3
프로모터
FOXP3 cDNA
P2A
㎷스트로베리
3'UTR
B

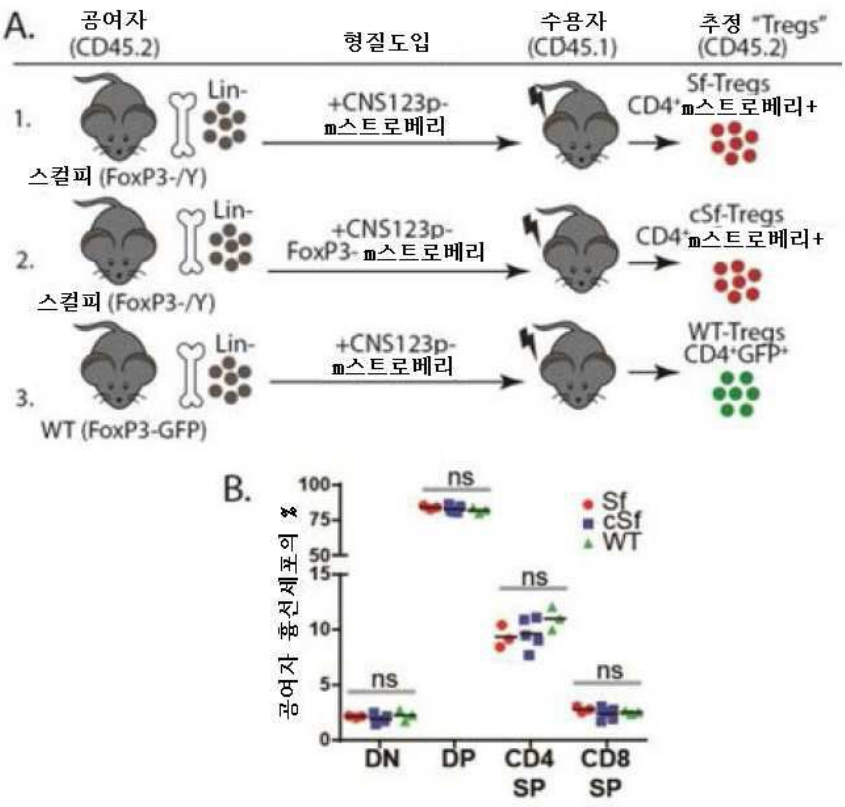
도면10ad


A.
아이소타입
FoxP3
비-형질도입된
+CNS123p-
㎷스트로베리
K562
K562
VCN = 5.1
주르카트
주르카트
VCN = 4.6
MT-2
MT-2
VCN = 6.6
모드로의 정규화
FoxP3
㎷스트로베리
B.
㎷스트로베리+세포
㎷스트로베리 MFI
벡터 복제 수
벡터 복제 수
K562 세포 (적혈골수세포 , FoxP3-)
주르카트(Teff-유사, FoxP3-)
MT-2 (Treg-유사, FoxP3+)
C. 공여자
(CD45.2)
형질도입
수용자
(CD45.1)
공여자 세포
(CD45.2)
Lin-
+CNS123p-㎷스트로베리
WT FoxP3-GFP
WT
계통 특이적 ㎷스트로베리 발현의 평가
D.
BM
흉선
c-Kit+
비장
B220+
Gr-1+
CD8+
CD4+ FoxP3-
CD4+ FoxP3+
DN
DP
CD8 SP
CD4+ FoxP3-
CD4+ FoxP3+
㎷스트로베리
㎷스트로베리

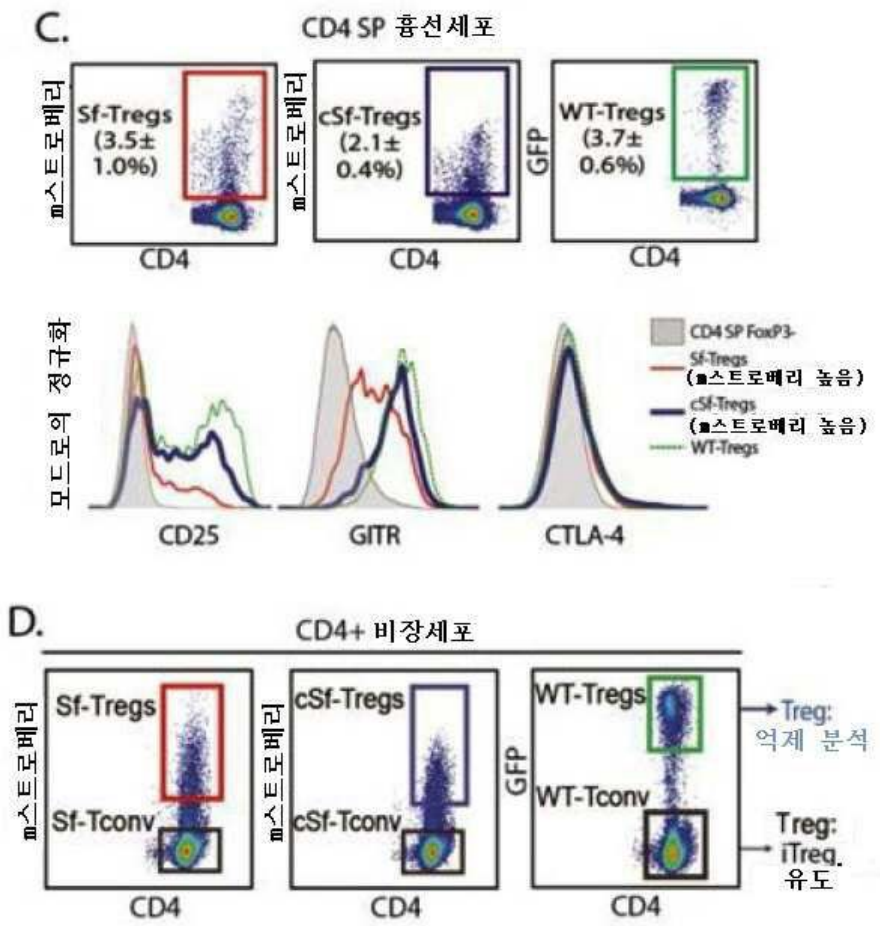
도면10e


E.
BM
비장
100
80
60
40
20
0
mast cell+%
ckit+ (HSPC)
Gr1+ (Gran.)
B220+ (B 세포)
CD8+ (CD8 T 세포)
CD4+ FoxP3- (Tconv)
CD4+ FoxP3+ (Treg)
흉선
CD4-CD8- (DN)
CD4+CD8+ (DP)
CD4-CD8+ (CD8 SP)
CD4+CD8- FoxP3- (CD4 Tconv)
CD4+CD8- FoxP3+ (CD4 Treg)

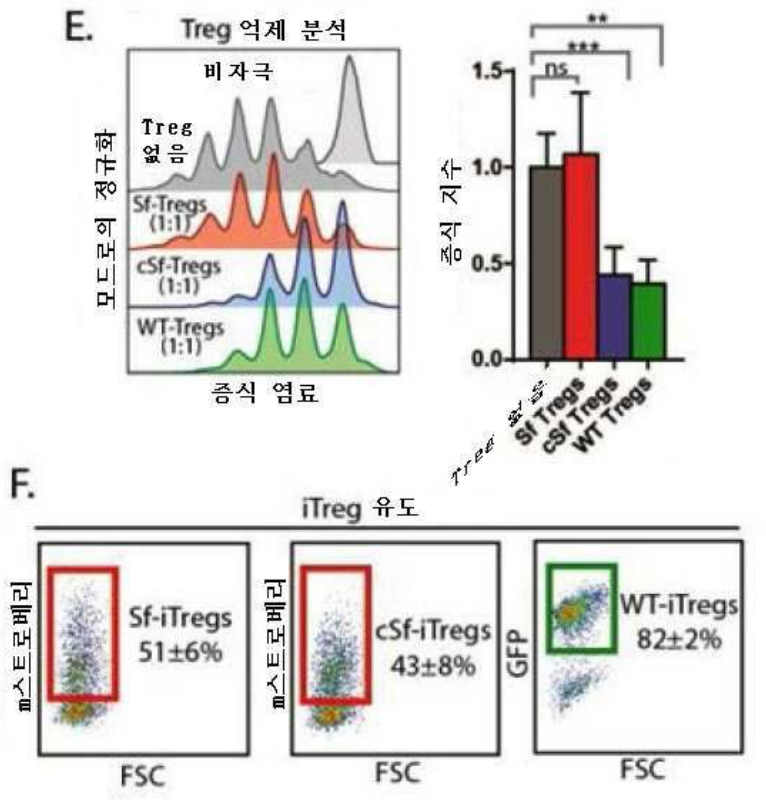
도면11ab


A.
공여자 (CD45.2)
형질도입
수용자 (CD45.1)
추정 "Tregs" (CD45.2)
1.
Lin-
+CNS123p-
mㅅㅌㄹㅔㅂㅣ
Sf-Tregs
CD4+mㅅㅌㄹㅔㅂㅣ+
스컬피 (FoxP3-/Y)
2.
Lin-
+CNS123p-
FoxP3- mㅅㅌㄹㅔㅂㅣ
cSf-Tregs
CD4+mㅅㅌㄹㅔㅂㅣ+
스컬피 (FoxP3-/Y)
3.
Lin-
+CNS123p-
mㅅㅌㄹㅔㅂㅣ
WT-Tregs
CD4+GFP+
WT (FoxP3-GFP)
B.
공여자 흉선세포의 %
100
75
50
15
10
5
0
ns
ns
ns
ns
Sf
cSf
WT
DN
DP
CD4 SP
CD8 SP

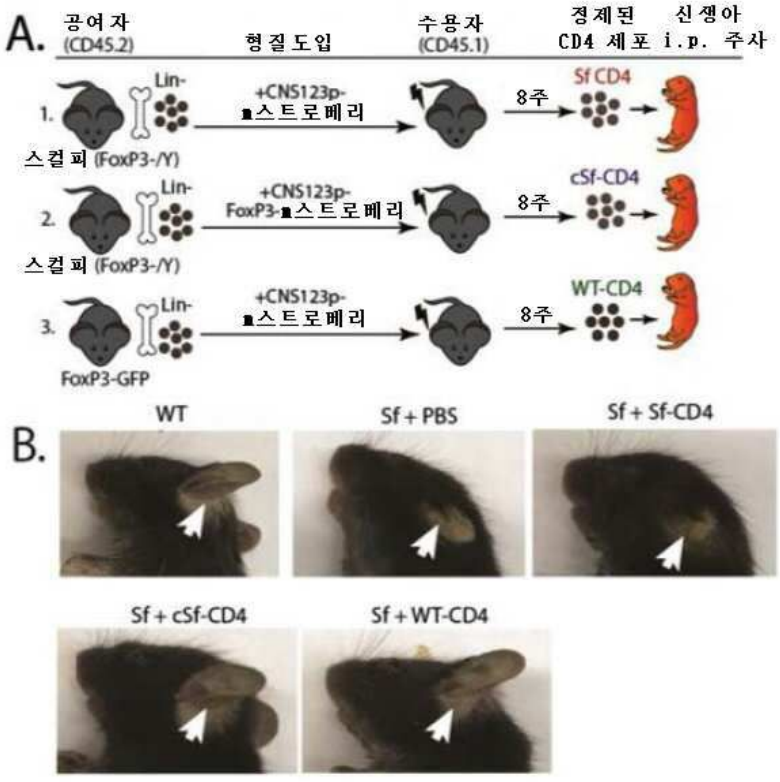
도면11cd


C.
CD4 SP 흉선세포
mSf-Tregs (3.5± 1.0%)
mcSf-Tregs (2.1± 0.4%)
GFP WT-Tregs (3.7± 0.6%)
CD4
CD4
CD4
모드로의 정규화
CD4 SP FoxP3-
Sf-Tregs (m스트로베리 높음)
cSf-Tregs (m스트로베리 높음)
WT-Tregs
CD25
GITR
CTLA-4
D.
CD4+ 비장세포
mSf-Tregs
Sf-Tconv
mcSf-Tregs
cSf-Tconv
GFP WT-Tregs
WT-Tconv
Treg: 억제 분석
Treg: iTreg 유도
CD4
CD4
CD4

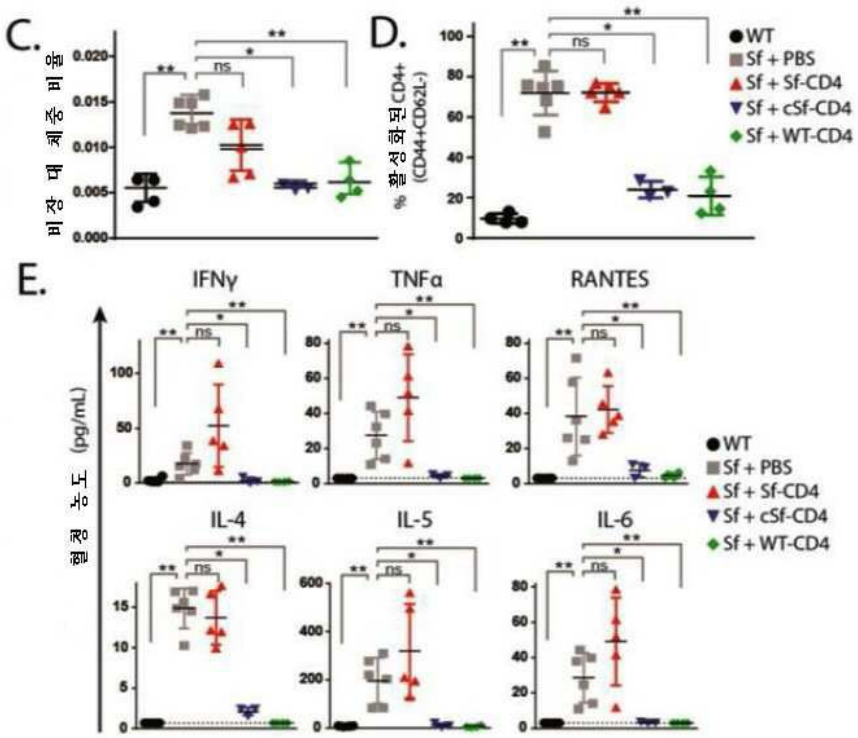
도면11ef



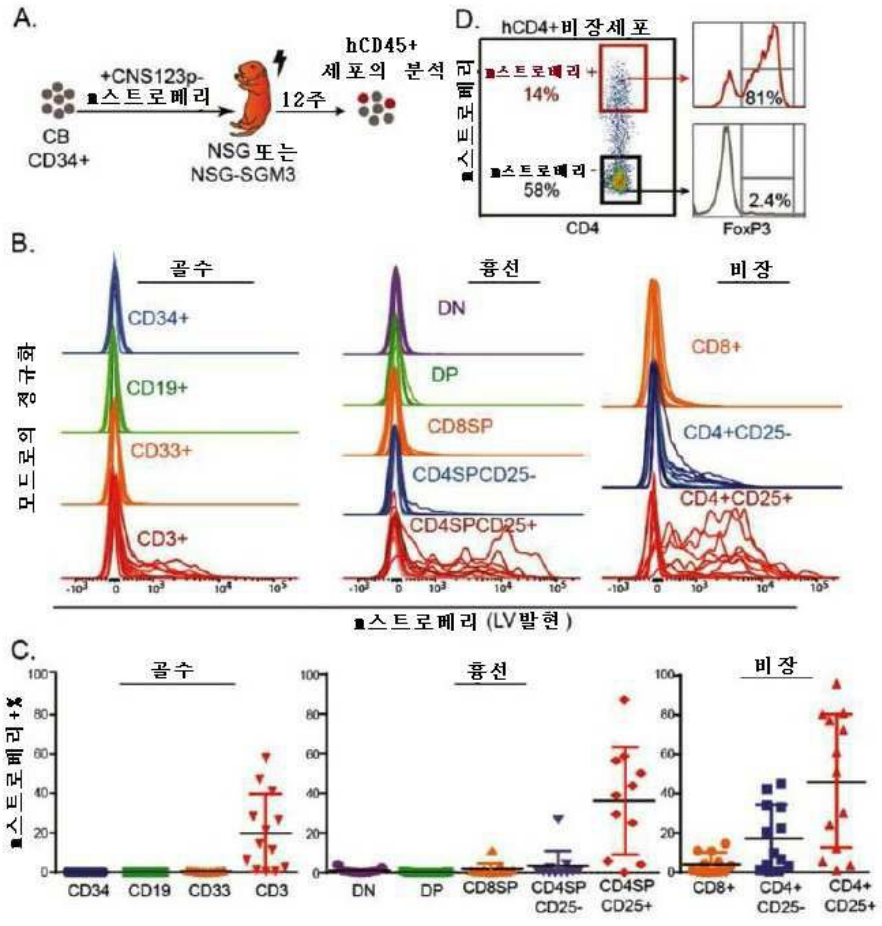
도면12ab



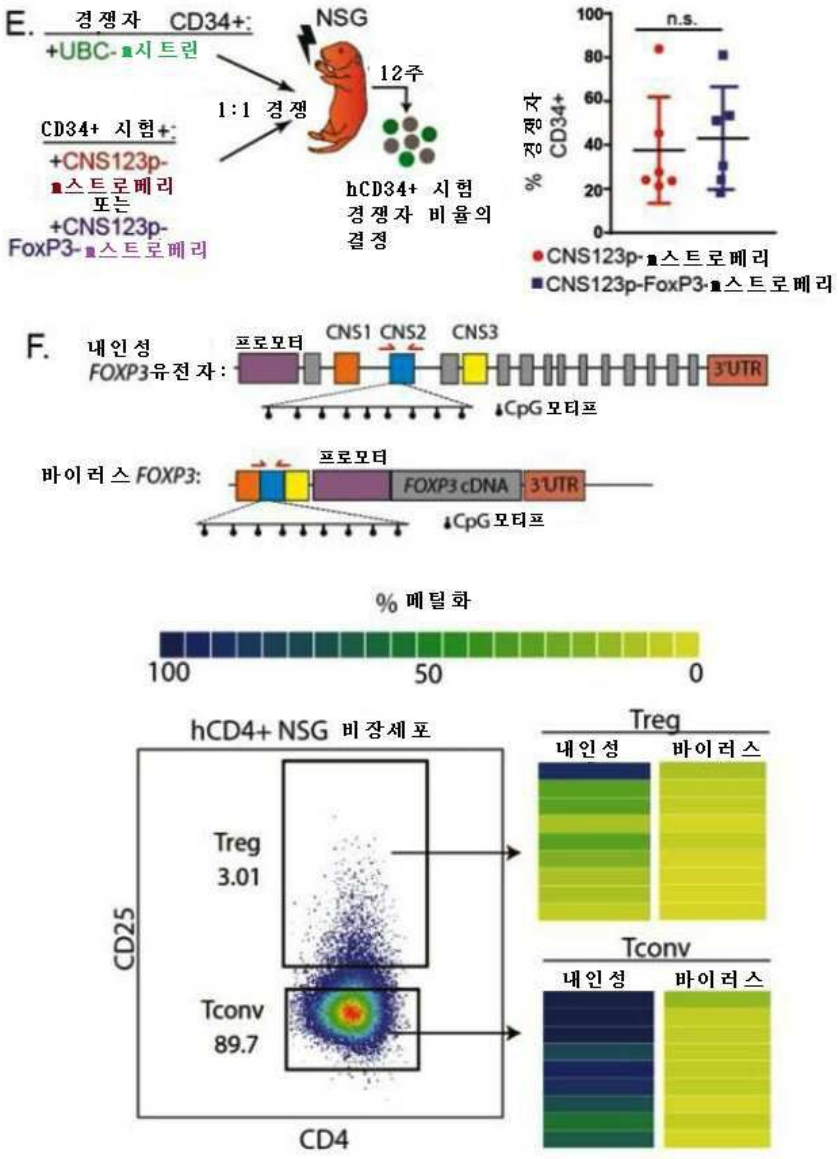
도면12ce



도면13ad

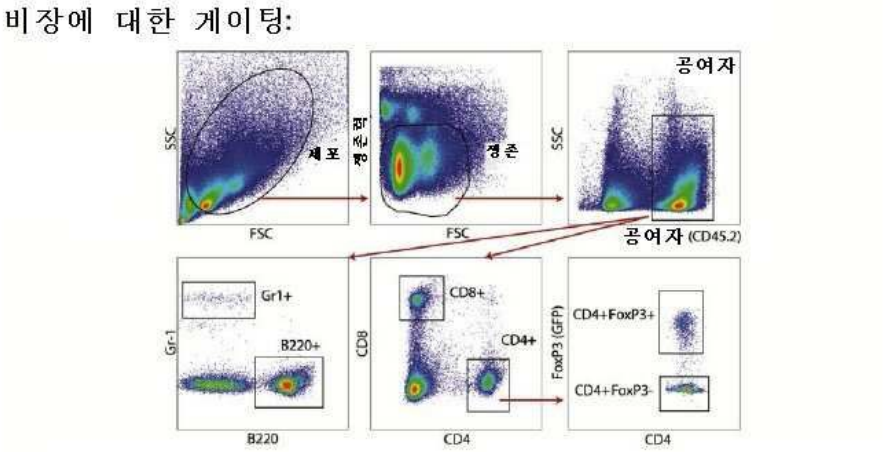


도면13ef

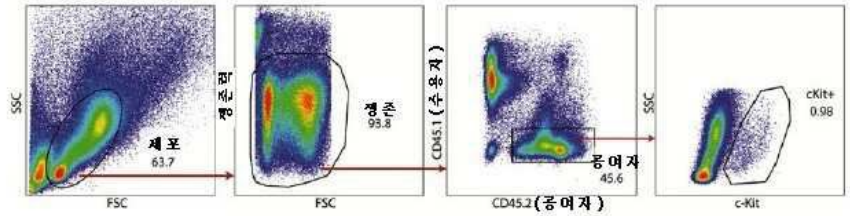

E.
경쟁자 CD34+:
+UBC-ᵦ시트린
CD34+ 시험+:
+CNS123p-ᵦ스트로베리
또는
+CNS123p-FoxP3-ᵦ스트로베리
NSG
12주
1:1 경쟁
hCD34+ 시험 경쟁자 비율의 결정
% 경쟁자 CD34+
n.s.
CNS123p-ᵦ스트로베리
CNS123p-FoxP3-ᵦ스트로베리
F.
내인성 FOXP3유전자:
프로모터
CNS1 CNS2 CNS3
3'UTR
CpG 모티프
바이러스 FOXP3:
FOXP3 cDNA
% 메틸화
100
50
0
hCD4+ NSG 비장세포
Treg
3.01
Tconv
89.7
CD25
CD4
Treg
내인성
바이러스
Tconv
내인성
바이러스

도면14

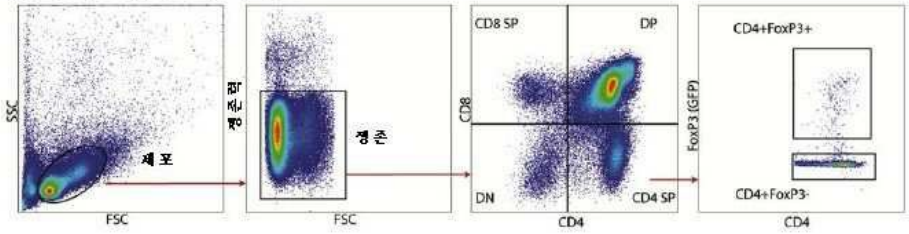
비장에 대한 게이팅:



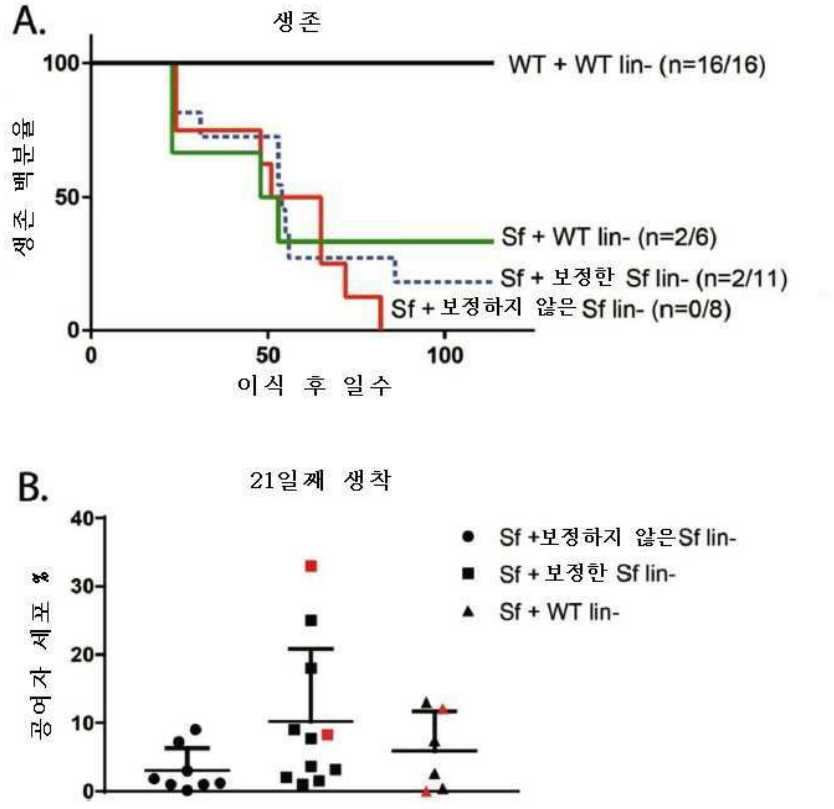
BM에 대한 게이팅:



흉선에 대한 게이팅:



도면15



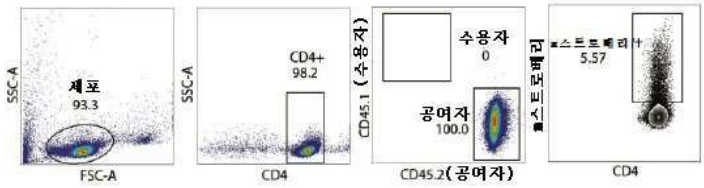
도면16a

A.

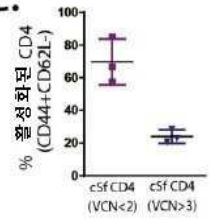
마우스	성별	그룹	CD4 세포 용량	CD4 VCN	총 CD4의 ■스트로베리+ % 또는 GFP+ %	추정 Treg 용량
1	M	WT + PBS	-	-	-	-
2	M	Sf + PBS	-	-	-	-
3	M	Sf + Sf-CD4	$8.0x10^{6}$	7.47	10.80%	$8.6x10^{5}$
4	M	Sf + cSf-CD4	$1.8x10^{7}$	3.25	5.45%	$9.8x10^{5}$
5	M	Sf + WT-CD4	$7.0x10^{6}$	3.31	11.20%	$7.8x10^{5}$
6	M	WT + PBS	-	-	-	-
7	F	Sf + Sf-CD4	$1.3x10^{7}$	7.05	16.10%	$2.1x10^{6}$
8	M	Sf + Sf-CD4	$1.3x10^{7}$	7.05	16.10%	$2.1x10^{6}$
9	M	Sf + WT-CD4	$1.3x10^{7}$	5.56	10.10%	$1.3x10^{6}$
10	F	Sf +WT-CD4	$1.3x10^{7}$	5.56	10.10%	$1.3x10^{6}$
11	F	Sf +WT-CD4	$1.3x10^{7}$	5.56	10.10%	$1.3x10^{6}$
12	F	Sf +Sf-CD4	$1.3x10^{7}$	7.05	16.10%	$2.1x10^{6}$
13	F	Sf +PBS	-	-	-	-
14	M	Sf +Sf-CD4	$1.3x10^{7}$	7.05	16.10%	$2.1x10^{6}$
15	M	Sf +PBS	-	-	-	-
16	M	Sf +PBS	-	-	-	-
17	M	WT +PBS	-	-	-	-
18	M	WT + PBS	-	-	-	-
19	F	Sf + cSf-CD4	$2.5x10^{7}$	5.8	5.6%	$1.4x10^{6}$
20	M	Sf + cSf-CD4	$2.5x10^{7}$	5.8	5.6%	$1.4x10^{6}$
21	M	Sf + PBS	-	-	-	-
22	F	Sf + PBS	-	-	-	-

도면16bd

B.



C.

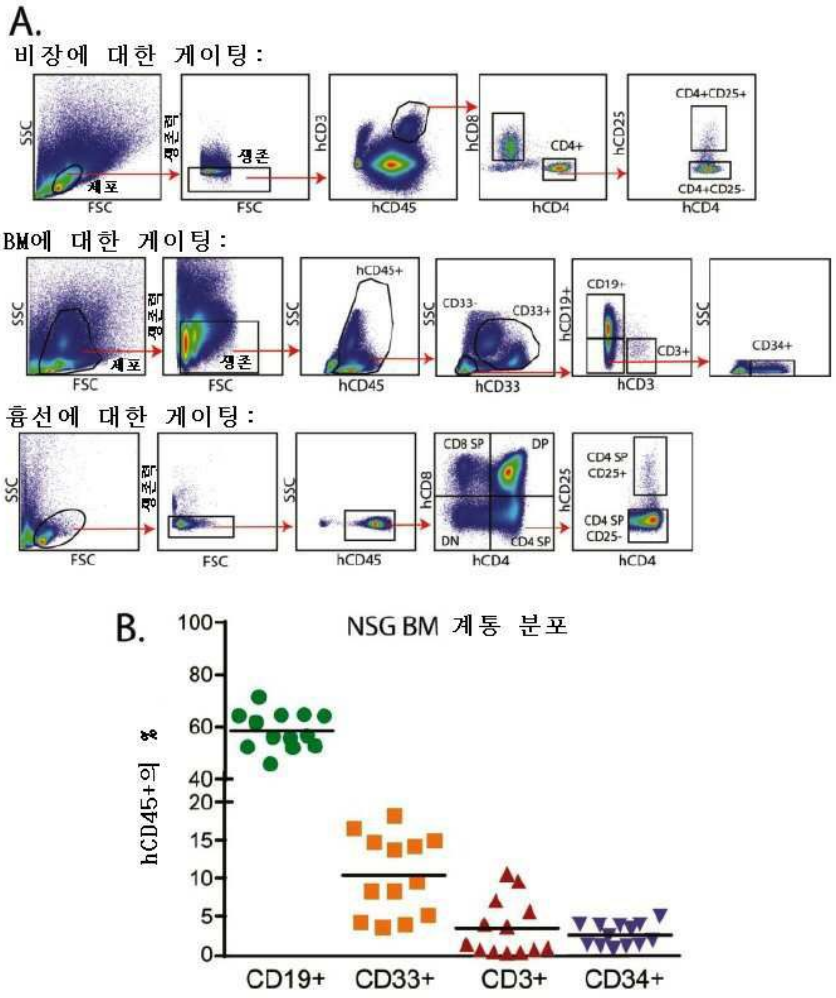


D.

VCN이 2 미만인 cSf-CD4

마우스	성별	그룹	CD4 세포 용량	CD4 VCN	총 CD4의 호스트로베리+ %	추정 Treg 용량
F1	M	Sf + cSf-CD4	$2.60x10^7$	1.4	2.69%	$7x10^5$
F1	M	Sf + cSf-CD4	$2.60x10^7$	1.4	2.69%	$7x10^5$
F3	M	Sf + cSf-CD4	$4.0x10^7$	1.78	2.76%	$1.1x10^6$

도면17


A.
비장에 대한 게이팅 :
SSC
FSC
세포
생존력
생존
hCD3
hCD45
hCD8
CD4+
hCD4
hCD25
CD4+CD25+
CD4+CD25-
BM에 대한 게이팅 :
hCD45+
CD33-
CD33+
hCD33
hCD19+
CD19+
CD3+
hCD3
CD34+
흉선에 대한 게이팅 :
CD8 SP
DP
DN
CD4 SP
CD4 SP CD25+
CD4 SP CD25-
B.
NSG BM 계통 분포
hCD45+의 %
100
80
60
40
20
15
10
5
0
CD19+
CD33+
CD3+
CD34+

도면18a

A.

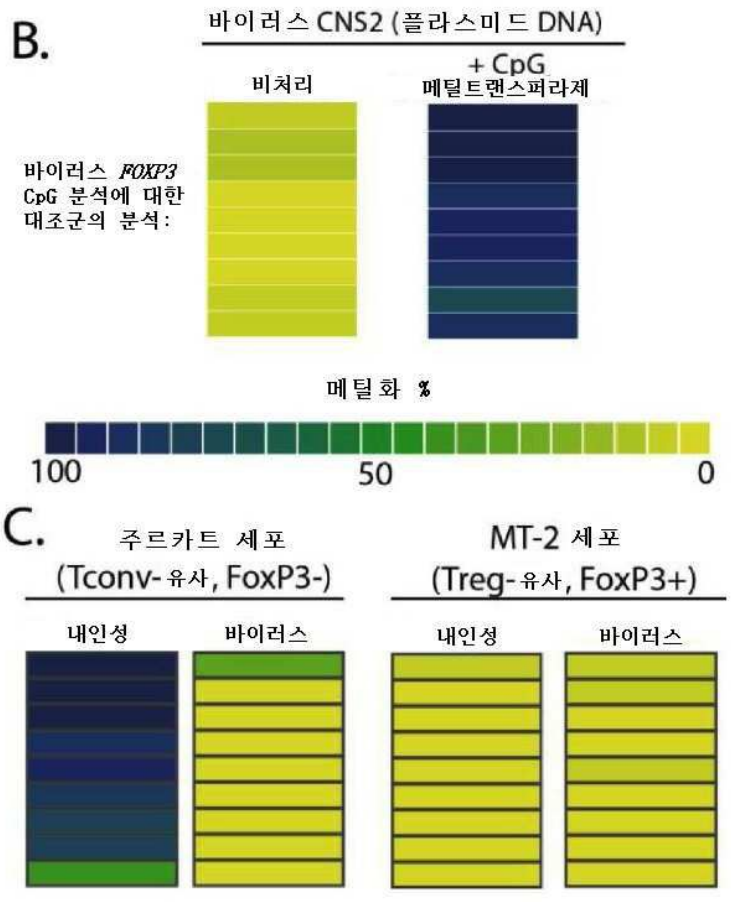
NSG 실험 #1
암컷 (XX) 제대혈 CD34+

CPG부위	#42	#41	#40	#39	#38	#37	#36	#35	#34
	내인성 CNS2 (절대적 메틸화)								
Treg	94.1	64.6	65.8	54.1	64.0	60.1	56.2	55.0	53.5
Tconv	100.0	100.0	100.0	86.9	97.3	95.7	83.7	77.5	82.5
	내인성 CNS2 (2X 염색체에 대한 정규화 (x-50)/50)								
Treg	88.3	29.2	31.7	8.1	28.1	20.2	12.4	9.9	7.0
Tconv	100.0	100.0	100.0	73.9	94.6	91.4	67.4	54.9	65.1
	바이러스 CNS2 (절대적 메틸화)								
Treg	10.5	3.1	3.8	0.0	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0
Tconv	15.1	4.6	6.8	3.7	5.9	5.2	0.0	3.3	0.0

NSG 실험 #2
암컷 (XX) 제대혈 CD34+

CPG부위	#42	#41	#40	#39	#38	#37	#36	#35	#34
	내인성 CNS2(절대적 메틸화)								
Treg	100.0	95.8	85.4	73.6	88.0	88.5	74.3	62.8	79.4
Tconv	100.0	98.9	99.2	84.1	95.1	91.1	78.9	75.0	86.1
	내인성 CNS2 (2X 염색체에 대한 정규화 (x-50)/50)								
Treg	100.0	91.6	70.9	47.1	76.0	77.0	48.6	25.7	58.8
Tconv	100.0	97.7	98.3	68.1	90.1	82.3	57.8	50.1	72.2
	바이러스 CNS2 (절대적 메틸화)								
Treg	11.9	3.1	5.7	0.0	3.5	0.0	0.0	0.0	0.0
Tconv	12.3	2.8	5.4	0.0	3.7	3.3	0.0	0.0	0.0

도면18bc



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> The Regents of the University of California

DONALD, KOHN B.

RONCAROLO, MARIA GRAZIA

HOLLIS, ROGER P.

MASIUK, KATELYN E.

<120> LENTIVIRAL VECTORS EXPRESSING FOXP3 IN HEMATOPOIETIC STEM CELLS TO TREAT IMMUINE DEFICIENCIES AND AUTOIMMUNE DISEASES

<130> UCLAP188WO

<140> PCT/US2018/047586

<141> 2018-08-22

<150> US 62/548,891

<151> 2017-08-22

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9841

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Foxp3 Expression Vector nucleotide sequence

<400> 1

caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttattt ttctaaatac 60

attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa 120

aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat 180

tttgccttcc tgtttttgct cacccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc 240

agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga 300

gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg 360

cggtattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc 420

agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag 480

taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc 540

tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg 600

taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg 660

acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac 720

ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac 780

cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg 840

agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg 900

tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg 960

agataggtgc ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac 1020

tttagattga tttaaaactt cattttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atccttttg 1080

ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg 1140

tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc 1200

aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc 1260

tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt 1320

agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc 1380

taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact 1440

caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac 1500

agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag 1560

aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg 1620

gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg 1680

tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca gggggggcgga 1740

gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt 1800

ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct 1860

ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg 1920

aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt 1980

aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta 2040

atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgta 2100

tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt 2160

acgccaagcg cgcaattaac cctcactaaa gggaacaaaa gctggagctg caagcttggc 2220

cattgcatac gttgtatcca tatcataata tgtacattta tattggctca tgtccaacat 2280

taccgccatg ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat 2340

tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg 2400

gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa 2460

cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat gggtggagta tttacggtaa actgcccact 2520
tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgccccc tattgacgtc aatgacggta 2580
aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg ggactttcct acttggcagt 2640
acatctacgt attagtcatc gctattacca tggtgatgcg gttttggcag tacatcaatg 2700
ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg 2760
ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc 2820
cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt 2880

tagtgaaccg gggtctctct ggttagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact 2940
agggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc 3000
ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa 3060
aatctctagc agtggcgccc gaacagggac ctgaaagcga aagggaaacc agaggagctc 3120
tctcgacgca ggactcggct tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg 3180
gtgagtacgc caaaaatttt gactagcgga ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc 3240
gtcagtatta agcgggggag aattagatcg cgatgggaaa aaattcggtt aaggccaggg 3300

ggaaagaaaa aatataaatt aaaacatata gtatgggcaa gcagggagct agaacgattc 3360
gcagttaatc ctggcctgtt agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta 3420
caaccatccc ttcagacagg atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc 3480
ctctattgtg tgcatcaaag gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata 3540
gaggaagagc aaaacaaaag taagaccacc gcacagcaag cggccgctga tcttcagacc 3600
tggaggagga gatatgaggg acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa 3660
aattgaacca ttaggagtag cacccaccaa ggcaaagaga agagtggtgc agagagaaaa 3720

aagagcagtg ggaataggag ctttgttcct tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat 3780
gggcgcagcg tcaatgacgc tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtgca 3840
gcagcagaac aatttgctga gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt 3900
ctggggcatc aagcagctcc aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca 3960
acagctcctg gggatttggg gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg 4020
gaatgctagt tggagtaata aatctctgga acagatggaa tcacacgacc tggatggagt 4080
gggacagaga aattaacaat tacacaagct taatacactc cttaattgaa gaatcgcaaa 4140

accagcaaga aaagaatgaa caagaattat tggaattaga taaatgggca agtttgtgga 4200

attggtttaa cataacaaat tggctgtggt atataaaatt attcataatg atagtaggag 4260

gcttggtagg tttaagaata gtttttgctg tactttctat agtgaataga gttaggcagg 4320

gatattcacc attatcgttt cagacccacc tcccaacccc gaggggaccc gacaggcccg 4380

aaggaataga agaagaaggt ggagagagag acagagacag atccattcga ttagtgaacg 4440

gatctcgacg gtatcgatct cgacacaaat ggcagtattc atccacaatt ttaaaagaaa 4500

agggggggatt ggggggtaca gtgcagggga aagaatagta gacataatag caacagacat 4560

acaaactaaa gaattacaaa aacaaattac aaaaattcaa aattttcggg tttattacag 4620

ggacagcaga gatccagttt gggtcgagga tatctaggtt agtctttttt tctgtggctt 4680

ctgtctctgg ttttgtgctt agaaagtcct ttcctacttg aaaatgagat aaatgttcac 4740

ctatgttggc ttctagtctc ttttatggct tcatttttc catttactat agaggttaag 4800

agtgtgggta ctggagccag actgtctggg acaaacccag cgtcacccca agccctatgt 4860

gtgattttta gccaggcact taacctctcc atccaagaag ggccaggtct tcagagctag 4920

gggcttgtca tagtggccag atggacatca cctaccacat ccaccagcac ccatgtcacc 4980

ccacctgggc caagcctgct gcaggacagg gcagccagtt ctcggaacga aacctgtggg 5040

gtggggtatc tgccctcttc tcttcctccg tggtgtcgat gaagcccggc gcatccggcc 5100

gccatgacgt caatggcgga aaaatctggg caagtcgggg gctgtgacaa cagggcccag 5160

atgcagaccc cgatatgaaa acataatctg tgtcccagaa acatccccca ttcagcttct 5220

gagaaaccca gtcagaaagg gacgtcccaa cagaggccct gggcccagga tggggcaggc 5280

agggtggggt acctggacct acaggtgccg acctttactg tggcactggg cgggaggggg 5340

gctggctggg gcacaggaag tggtttctgg gtcccaggca agtctgtgac ttatgcagat 5400

gttgcagggc caagaaaatc cccacctgcc aggcctcaga gattggaggc tctccccgac 5460

ctcccaatcc tcccatccac acatagagct tcagattctc tttctttccc cagagaccct 5520

caaatatcct ctcactcaca gaatggtgtc tctgcctgcc tcgggttggc cctgtgattt 5580

attttagttc ttttcccttg ttttttttt ttcaaactct atacactttt gttttaaaaa 5640

ctgtggtttc tcatgagccc tattatctca ttgatacctc tcacctctgt ggtgagggga 5700

agaaatcata ttttcagatg actcgtaaag ggcaaagaaa aaaacccaaa atttcaaaat 5760

ttccgtttaa gtctcataat caagaaaagg agaaacacag agagagagaa aaaaaaaact 5820

atgagaaccc ctccccaccc cgtgattatc agcgcacaca ctcatcgaaa aaaatttgga 5880

ttattagaag agagaggtct gcggcttcca caccgtacag cgtggttttt cttctcggta 5940

taaaagcaaa gttgtttttg atacgtgaca gtttcccaca agccaggctg atccttttct 6000

gtcagtccac ttcaccaagc ctgcccttgg acaaggaccc gatgcccaac cccaggcctg 6060

gcaagccctc ggcccccttcc ttggcccttg gcccatcccc aggagcctcg cccagctgga 6120

gggctgcacc caaagcctca gacctgctgg gggcccgggg cccaggggga accttccagg 6180

gccgagatct tcgaggcggg gcccatgcct cctcttcttc cttgaacccc atgccaccat 6240

cgcagctgca gctgcccaca ctgcccctag tcatggtggc accctccggg gcacggctgg 6300

gcccccttgcc ccacttacag gcactcctcc aggacaggcc acatttcatg caccagctct 6360

caacggtgga tgcccacgcc cggacccctg tgctgcaggt gcacccccctg gagagcccag 6420

ccatgatcag cctcacacca cccaccaccg ccactggggt cttctccctc aaggcccggc 6480

ctggcctccc acctgggatc aacgtggcca gcctggaatg ggtgtccagg gagccggcac 6540

tgctctgcac cttcccaaat cccagtgcac ccaggaagga cagcaccctt tcggctgtgc 6600

cccagagctc ctacccactg ctggcaaatg gtgtctgcaa gtggcccgga tgtgagaagg 6660

tcttcgaaga gccagaggac ttcctcaagc actgccaggc ggaccatctt ctggatgaga 6720

agggcagggc acaatgtctc ctccagagag agatggtaca gtctctggag cagcagctgg 6780

tgctggagaa ggagaagctg agtgccatgc aggcccacct ggctgggaaa atggcactga 6840

ccaaggcttc atctgtggca tcatccgaca agggctcctg ctgcatcgta gctgctggca 6900

gccaaggccc tgtcgtccca gcctggtctg gcccccggga ggcccctgac agcctgtttg 6960

ctgtccggag gcacctgtgg ggtagccatg gaaacagcac attcccagag ttcctccaca 7020

acatggacta cttcaagttc cacaacatgc gacccccttt cacctacgcc acgctcatcc 7080

gctgggccat cctggaggct ccagagaagc agcggacact caatgagatc taccactggt 7140

tcacacgcat gtttgccttc ttcagaaacc atcctgccac ctggaagaac gccatccgcc 7200

acaacctgag tctgcacaag tgctttgtgc gggtggagag cgagaagggg gctgtgtgga 7260

ccgtggatga gctggagttc cgcaagaaac ggagccagag gcccagcagg tgttccaacc 7320

ctacacctgg cccctgatga cctcaagatc aaggaaagga ggatggacga acaggggcca 7380

aactggtggg aggcagaggt ggtgggggca gggatgatag gccctggatg tgcccacagg 7440

gaccaagaag tgaggtttcc actgtcttgc ctgccagggc ccctgttccc ccgctggcag 7500

ccacccccctc ccccatcata tcctttgccc caaggctgct cagaggggcc ccggtcctgg 7560

ccccagcccc cacctccgcc ccagacacac cccccagtcg agccctgcag ccaaacagag 7620

ccttcacaac cagccacaca gagcctgcct cagctgctcg cacagattac ttcagggctg 7680

gaaaagtcac acagacacac aaaatgtcac aatcctgtcc ctcactcaac acaaacccca 7740

aaacacagag agcctgcctc agtacactca aacaacctca aagctgcatc atcacacaat 7800

cacacacaag cacagccctg acaacccaca caccccaagg cacgcaccca cagccagcct 7860

cagggcccac aggggcactg tcaacacagg ggtgtgccca gaggcctaca cagaagcagc 7920

gtcagtaccc tcaggatctg aggtcccaac acgtgctcgc tcacacacac ggcctgttag 7980
aattcacctg tgtatctcac gcatatgcac acgcacagcc ccccagtggg tctcttgagt 8040
cccgtgcaga cacacacagc cacacacact gccttgccaa aaataccccg tgtctcccct 8100
gccactcacc tcactcccat tccctgagcc ctgatccatg cctcagctta gactgcagag 8160
gaactactca tttatttggg atccaaggcc cccaacccac agtaccgtcc ccgaattcga 8220
gctcggtacc tttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc cacttttaa 8280
aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaacg aagacaagat cagagcgaga 8340

ttccgtctca aagaaaaaaa aagtaatgaa atgaataaaa tgagtcctag agccagtaaa 8400
tgtcgtaaat gtctcagcta gtcaggtagt aaaaggtctc aactaggcag tggcagagca 8460
ggattcaaat tcagggctgt tgtgatgcct ccgcagactc tgagcgccac ctggtggtaa 8520
tttgtctgtg cctcttctga cgtggaagaa cagcaactaa cacactaaca cggcatttac 8580
tatgggccag ccattgttgc tttttgcttg tactgggtct ctctggttag accagatctg 8640
agcctgggag ctctctggct aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc 8700
ttgagtgctt caagtagtgt gtgcccgtct gttgtgtgac tctggtaact agagatccct 8760

cagacccttt tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagtagt agttcatgtc atcttattat 8820
tcagtattta taacttgcaa agaaatgaat atcagagagt gagaggaact tgtttattgc 8880
agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt 8940
tcactgcatt ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggctc 9000
tagctatccc gcccctaact ccgcccatcc cgcccctaac tccgcccagt tccgcccatt 9060
ctccgcccca tggctgacta attttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct 9120
ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcgtcgaga 9180

cgtacccaat tcgccctata gtgagtcgta ttacgcgcgc tcactggccg tcgttttaca 9240
acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat cgccttgcag cacatccccc 9300
tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg 9360
cagcctgaat ggcgaatggc gcgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt 9420
ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ctagcgcccg ctcctttcgc 9480
tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg 9540
gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta 9600

gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt 9660

ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat 9720

ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa 9780

tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt ttacaatttc 9840

c 9841

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR primer

<400> 2

aagtagtgtg tgcccgtctg 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR primer

<400> 3

cctctggttt ccctttcgct 20

<210> 4

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR probe

<400> 4

ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctag 37

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR primer

<400> 5

cgccccctcc tcaccattat 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR primer

<400> 6

catcacaacc atcgctgcct 20

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR probe

<400> 7

ttaccttgct tgtcggacca aggca 25

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR primer

<400> 8

cagggtctgg gagccaagt 19

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR primer

<400> 9

gcacagtgct ggacattgac a 21

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR probe

<400> 10

cccaccgaac ccaagaaact agaggagaat 30

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR primer

<400> 11

tggagttaga ttgtttggga 20

<210> 12

<211> 24

<212

> DNA

<213> Artificial

<220><223> PCR primer

<400> 12

cacctataaa tccaaatacc ccac 24